



Universitat
Rovira i Virgili

Facultat de Medicina i Ciències de la Salut
Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques

**Filogenia molecular i caracterització
fenotípica del complex d'espècies
d'*Sporothrix schenckii***

Rita Marimon Picó
Tesi doctoral, 2007

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

FILOGÈNIA MOLECULAR I CARACTERITZACIÓ FENOTÍPICA DEL COMPLEX D'ESPÈCIES DE
SPOROTHRIX SCHENCKII

Rita Marimón Picó

ISBN: 978-84-691-1554-1 /DL:T.147-2008

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
FILOGÈNIA MOLECULAR I CARACTERITZACIÓ FENOTÍPICA DEL COMPLEX D'ESPÈCIES DE
SPOROTHRIX SCHENCKII
Rita Marimón Picó
ISBN: 978-84-691-1554-1 /DL:T.147-2008

“...el temps no compta ni l'espai,
qualsevol nit pot sortir el Sol”

Jaume Sisa

Als meus pares

Al Pere

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

FILOGÈNIA MOLECULAR I CARACTERITZACIÓ FENOTÍPICA DEL COMPLEX D'ESPÈCIES DE
SPOROTHRIX SCHENCKII

Rita Marimón Picó

ISBN: 978-84-691-1554-1 /DL:T.147-2008



UNITAT DE MICROBIOLOGIA

Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques
Facultat de Medicina i Ciències de la Salut
Universitat Rovira i Virgili

Josep Guarro Artigas, Catedràtic de Microbiologia de la Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, José F. Cano Lira Catedràtic de l'Escola Universitària de la Facultat d'Enologia, de la Universitat Rovira i Virgili i Josepa Gené Díaz Professora Titular d'Universitat de la Facultat de Medicina i Ciències de la Salut

CERTIFIQUEN QUE:

La Tesi Doctoral titulada "**FILOGÈNIA MOLECULAR I CARACTERITZACIÓ FENOTÍPICA DEL COMPLEX D'ESPÈCIES D'*SPOROTHRIX SCHENCKII***", presentada per Rita Marimon Picó, ha estat realitzada sota la seva direcció i compleix els requisits necessaris per a optar al títol de Doctor.

I perquè se'n prengui coneixement i tingui els efectes que correspongui, signem aquesta certificació.

Reus, 1 d'Octubre de 2007

Dr. Josep Guarro

Dr. Josep Cano

Dra. Josepa Gené

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

FILOGÈNIA MOLECULAR I CARACTERITZACIÓ FENOTÍPICA DEL COMPLEX D'ESPÈCIES DE
SPOROTHRIX SCHENCKII

Rita Marimón Picó

ISBN: 978-84-691-1554-1 /DL:T.147-2008

AGRAÏMENTS

En aquestes primeres línies vull donar les gràcies a totes les persones que d'una manera o d'una altra, volent-ho o sense, m'han ajudat en l'elaboració d'aquesta tesi.

En primer lloc al Dr. Josep Guarro per acceptar-me al seu grup de treball, per la direcció de la tesi i per exigir tant com dóna.

A la Dra. Josepa Gené per ajudar-me sempre que ho he necessitat, per ensenyar-me a estimar al "meu *Sporothrix*", i sobretot per les seves valuoses i rigoroses correccions. Moltes gràcies.

Al Dr. Josep Cano, per introduir-me en la biologia molecular i per ser sempre tant proper a nosaltres.

Al Dr. Francesc Xavier Pastor pels seus consells clínics i per la seva amistat.

Als Drs. Alberto Stchigel, Maria José Figueras i Emili Mayayo per haver-me ajudat quan ho he necessitat.

Al Fèlix, el meu mestre i company de despatx i bromes, realment sense tu m'hagués costat tirar endavant.

A la Mònica amb qui vaig començar aquest camí, he tingut molta sort de tenir-te al costat, gràcies pels teus somriures.

A la Carol pel teu gran ajut amb tot el relacionat amb els antifúngics i per la teva gran amistat, que sé que no s'acabarà amb aquesta tesi.

Al Marçal, moltes gràcies per l'ajut amb els animals i els antifúngics, i per la paciència que has tingut al aguantar a tanta dona junta.

A la Mar, gràcies també per l'ajut amb els ratolins, i per deixar-me compartir amb tu tots els preparatius de boda.

A la Cati, la Núria i la Carme, les meves tècnics i amigues, si pugues us portaria amb mi allà on fos, gràcies a vosaltres també.

A tots els companys de laboratori sobretot a la Gisela amb qui vaig compartir el primer any, a la Carolina, la Mabel, el Fredi, la Clara, la Lara, la Belkys, la Dania, l'Enric, el Luis, la Mery, el Xavi i la Montse.

A les pacients secretaries del departament, la Montse i l'Imma, per facilitar-me les coses sempre que heu pogut.

A les meves amigues l'Emma, la Sònia, la Belen, la Mònica l'Anna, l'Aida i la Mireia no us ho imagineu però la vostra amistat i confiança també és la responsable d'aquesta tesi.

Al Pere, per estimar-me tant, segur que junts superarem tot el que ens vingui.

I sobretot als meus pares i germans, per creure tant en mi. Potser encara no us ho havia dit mai: **MOLTES GRÀCIES**, us estimo molt.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
FILOGÈNIA MOLECULAR I CARACTERITZACIÓ FENOTÍPICA DEL COMPLEX D'ESPÈCIES DE
SPOROTHRIX SCHENCKII
Rita Marimón Picó
ISBN: 978-84-691-1554-1 /DL:T.147-2008

ÍNDEX

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

FILOGÈNIA MOLECULAR I CARACTERITZACIÓ FENOTÍPICA DEL COMPLEX D'ESPÈCIES DE
SPOROTHRIX SCHENCKII

Rita Marimón Picó

ISBN: 978-84-691-1554-1 /DL:T.147-2008

ÍNDEX D'ABREVIACIONS ix

1 INTRODUCCIÓ 1

1.1	<i>Sporothrix schenckii</i> Hektoen i C.F. Perkins.....	1
1.1.1	Història i ubicació taxonòmica.....	1
1.1.2	Característiques morfològiques	5
1.1.3	Característiques fisiològiques.....	9
1.1.4	Interès en clínica.....	11
1.1.5	Epidemiologia	15
1.1.6	Tractament	17
1.2	Taxonomia molecular.....	20
1.2.1	Concepte d'espècie	20
1.2.2	Filogènia molecular	23
1.2.3	Mètodes filogenètics.....	25
1.2.4	Gens estudiats en la construcció d'arbres filogenètics	27
1.3	Sensibilitat antifúngica	33
1.4	Estudis de patogenicitat	35

2 INTERÈS DEL TREBALL I OBJECTIUS 39

3 MATERIALS I MÈTODES 43

3.1	Soques utilitzades. Conservació.....	43
3.1.1	Origen i activació de mostres per a l'obtenció de soques ambientals	43
3.1.2	Aïllament i obtenció de cultius purs	43
3.1.3	Conservació dels cultius.....	44
3.2	Estudis morfològics.....	45
3.2.1	Estudis culturals	45
3.2.2	Estudis microscòpics	45
3.2.2.1	Preparació directa	46
3.2.2.2	Microcultiu	46
3.2.3	Medis de cultiu i de muntatge.....	47

3.2.3.1	Medis de cultiu	48
3.2.3.2	Medis de muntatge per a l'observació microscòpica dels aïllaments.....	50
3.3	Estudi fisiològic	51
3.3.1	Efecte de la temperatura	51
3.3.2	Assimilació de carbohidrats i nitrats	51
3.3.3	Presència de l'enzim ureasa	52
3.3.4	Formació extracel·lular de polisacàrids.....	52
3.3.5	Producció d'àcids	53
3.3.6	Liquat de la gelatina.....	53
3.3.7	Resistència a diferents concentracions de cicloheximida, NaCl i Mg Cl ₂	53
3.4	Tècniques de biologia molecular	54
3.4.1	Extracció d'ADN.....	54
3.4.2	Amplificació dels gens	55
3.4.3	Seqüenciació dels productes de la PCR	57
3.4.4	Precipitació i preparació per la seqüenciació	57
3.4.5	Alineament de les seqüències i anàlisis filogenètiques.....	58
3.4.6	Dipòsit de seqüències	60
3.5	Estudi de sensibilitat <i>in vitro</i> als antifúngics. Tècnica de microdilució	61
3.5.1	Antifúngics utilitzats.....	61
3.5.2	Preparació de les microplaques d'antifúngics	62
3.5.3	Preparació dels inòculs	63
3.5.4	Lectura e interpretació dels resultats.....	64
3.6	Estudi de patogenicitat.....	65
4	RESULTATS I DISCUSSIÓ	67
4.1	Filogènia molecular d' <i>Sporothrix schenckii</i>	69
	<i>Journal of Clinical Microbiology</i> 44:3251-3256. 2006	

4.2	<i>S. brasiliensis</i> , <i>S. globosa</i> i <i>S. mexicana</i> , tres noves espècies d' <i>Sporothrix</i> d'interès clínic.....	87
	<i>Journal of Clinical Microbiology</i> 45:3198-3206. 2007	
4.3	Sensibilitat antifúngica <i>in vitro</i> a 5 espècies d' <i>Sporothrix</i>	115
	<i>Antimicrobial Agents and Chemotherapy</i> . Sotmès	
4.4	<i>Sporothrix luriei</i> un fong rar d'origen clínic.....	125
	<i>Clinical Microbiology and Infection</i> . Sotmès	
4.5	Diferències en la virulència de les espècies d' <i>Sporothrix</i> d'interès clínic en un model murí	135
	<i>Microbes and Infection</i> . Sotmès	
5	DISCUSSIÓ GENERAL	147
5.1	Estudi molecular	147
5.2	Estudi fenotípic	152
5.3	Estudi de sensibilitat <i>in vitro</i> als antifúngics	154
5.4	Estudi de patogenicitat.....	156
6	CONCLUSIONS	161
7	BIBLIOGRAFIA	165
Annex 1.	Soques incloses a l'estudi	191
Annex 2.	Molecular phylogeny of <i>Sporothrix schenckii</i>	199
Annex 3.	<i>Sporothrix brasiliensis</i> , <i>S. globosa</i> and <i>S. mexicana</i> , three new <i>Sporothrix</i> species of clinical interest	207
Annex 4.	<i>In vitro</i> antifungal susceptibilities of 5 species of <i>Sporothrix</i> ..	219
Annex 5.	<i>Sporothrix luriei</i> a rare fungus from clinical origin	233

Annex 6. Different virulence of the species of <i>sporothrix</i> of clinical interest in a murine model	249
Annex 7. Resultats proves fisiològiques.....	263

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
FILOGÈNIA MOLECULAR I CARACTERITZACIÓ FENOTÍPICA DEL COMPLEX D'ESPÈCIES DE
SPOROTHRIX SCHENCKII
Rita Marimón Picó
ISBN: 978-84-691-1554-1 /DL:T.147-2008

ÍNDIX D'ABREVIACIONS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

FILOGÈNIA MOLECULAR I CARACTERITZACIÓ FENOTÍPICA DEL COMPLEX D'ESPÈCIES DE
SPOROTHRIX SCHENCKII

Rita Marimón Picó

ISBN: 978-84-691-1554-1 /DL:T.147-2008

ABC	Albaconazol
ADN	Àcid desoxiribonucleic
ADNr	ADN ribosòmic
AMB	Amfotericina B
ARN	Àcid ribonucleic
BCCM/IHEM	Culture Collection of the Scientific Institut of Public Health
BLAST	Basic Alignment Search Tool
Bt2	Beta-tubulina
CAL	Calmodulina
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures
CHS	Quitina sintasa
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMA	Agar de moresc
CMI	Concentració mínima inhibidora
CML	Concentració mínima letal
CO ₂	Diòxid de carboni
DMSO	Dimetilsulfòxid
dNTP	Desoxinucleòtids trifosfat
DRBC	Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol
EBC	Eberconazol
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
EUA	Estats Units d'Amèrica
FLC	Fluconazol
FMR	Facultat de Medicina de Reus
IMI	l'International Mycological Institute
ITC	Itraconazol
ITS	Internal Transcribed Spacer (espaiador intern)
KTC	Ketoconazol
LCR	Líquid cefaloraquidi
MFG	Micafungina
MG	Mitja geomètrica

MP	Màxima parsimònia
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
NJ	Neighbour-Joining
OA	Agar farina de civada
ORF	Open Reading Frame
PAUP	Phylogenetic Analysis Using Parsimony
Pb	Parell de bases
PCA	Agar de patata pastanaga
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa
PDA	Agar de patata dextrosa
PHT	Test de partició homogènia
PSC	Posaconazol
RFLP	Restriction Fragment Length Polimorphism
RVC	Ravuconazol
T	Espècie tipus
TBF	Terbinafina
Tm	Temperatura de Melting
U	Unitats
UFC o CFU	Unitats formadores de colònies
VRC	Voriconazol
5-FC	5-Fluorocitosina

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
FILOGÈNIA MOLECULAR I CARACTERITZACIÓ FENOTÍPICA DEL COMPLEX D'ESPÈCIES DE
SPOROTHRIX SCHENCKII
Rita Marimón Picó
ISBN: 978-84-691-1554-1 /DL:T.147-2008

1. INTRODUCCIÓ

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

FILOGÈNIA MOLECULAR I CARACTERITZACIÓ FENOTÍPICA DEL COMPLEX D'ESPÈCIES DE
SPOROTHRIX SCHENCKII

Rita Marimón Picó

ISBN: 978-84-691-1554-1 /DL:T.147-2008

1. INTRODUCCIÓ

1.1 *Sporothrix schenckii* Hektoen i C.F. Perkins

Sporothrix schenckii és l'agent causal de l'espótricosi, o també coneguda com la malaltia del jardiner degut a que al manipular plantes, com ara rosers, sovint colonitzades per aquest fong són els qui en pateixen les conseqüències.

L'espótricosi és una infecció subcutània crònica de distribució mundial, encara que és més freqüent en països amb clima tropical o subtropical, com ara Brasil, Veneçuela o Mèxic, entre altres (Rivitti i Aoki 1999). L'adquisició és bàsicament per inoculació traumàtica a partir de material vegetal contaminat, i és freqüent que l'afectació s'estengui als ganglis limfàtics, ocasionant espótricosi limfocutània.

S. schenckii es caracteritza per ser un fong dimòrfic, és a dir, que té la capacitat de créixer com un fong filamentós a temperatura ambient i en forma de llevat a 37°C en medis enriquits o en els teixits parasitats.

1.1.1 Història i ubicació taxonòmica

El primer qui va aïllar una soca d'*S. schenckii* va ser Benjamin Schenck el 1898, quan era un estudiant de Medicina a l'Hospital Johns Hopkins a Baltimor, Estats Units. Després d'aïllar el possible agent causal d'una infecció que patia un pacient de 36 anys amb múltiples nòduls ulcerants ascendents al braç, pròxims a una ferida del dit índex, Schenck el va enviar al micòleg Erwin Smith, qui va concloure que es tractava d'un fong pertanyent al gènere *Sporotrichum* Link (Schenck 1898). Dos anys més tard, també als Estats Units, es va donar a conèixer el segon cas d'aquesta micosi (Hektoen i Perkins 1900). Hektoen i Perkins van descriure amb detall el cas, així com la morfologia del fong pel qual van proposar un nou gènere que van denominar *Sporothrix* Hektoen i C.F. Perkins.

El 1903, de Buermann i Raimond van publicar el primer cas d'espótricosi a Europa; el fong cultivat va ser estudiat per Matruchot, el qual el va denominar *Sporotrichum beurmanni* Matr. & Ramond. Al llarg dels següents 10 anys, de Buermann i Gurgeot van reportar més de 200 casos d'espótricosis a França que incloïen formes extracutànies i disseminades de la malaltia. Més tard, les soques de França i dels Estat Units es varen reconèixer com a idèntiques i des d'aleshores l'agent etiològic de l'espótricosi es considera una espècie única a la que es va anomenar *Sporotrichum schenckii* (Hektoen i C.F. Perkins) Beurm. i Gougerot. Carmichael, el 1962, va veure que l'agent de l'espótricosi tenia una conidiogènesi diferent de la que caracteritza al gènere *Sporotrichum* i va proposar recuperar l'antiga denominació d'*Sporothrix schenckii*, nom que va ser validat per Nicot i Mariat el 1973 (Carmichael 1962, Nicot i Mariat 1973).

Lutz i Splendore (1907), qui varen reportar el primer cas d'espótricosi a Brasil el 1907, van trobar que era possible cultivar la forma llevaduriform del fong, tot i que la transició dimòrfica d'*S. schenckii* no va ser descrita fins el 1961 per Howard (Howard 1961).

L'any 1970 es va descriure *Dolichoascus schenckii* Thribaut i Ansel com a fase sexual (teleomorf) d'*S. schenckii* (Ansel i Tribaut 1970), en base a unes endospores que es varen observar al miceli, però un any més tard Mariat i Diez (1971) varen publicar que es tractava d'una interpretació errònia i que en realitat eren endoconidis que *S. schenckii* es capaç de formar en cultius líquids de més de 4 mesos d'incubació. Van ser els mateixos Mariat i col·laboradors (Mariat *et al.* 1968, Mariat 1971a, b, Nicot i Mariat 1973) els primers en apuntar la possibilitat de que *Ophiostoma stenoceras* Robak podria ser el teleomorf d'*S. schenckii* i des d'aleshores s'han realitzat nombrosos estudis per tal de demostrar aquesta relació. Els resultats d'aquests estudis sovint eren contradictoris, alguns suggerien que *O. stenoceras* era el teleomorf d'*S. schenckii* (Taylor 1970, De Hoog 1974) i d'altres mostraven diferències entre aquests dos fongs (Mendonça-Hagler *et al.* 1974, Travassos *et al.* 1974, Suzuki *et al.* 1988). Malgrat que es va

concloure que *S. schenckii* no era l'anamorf d'*O. stenoceras* (Travassos i Lloyd 1980) les relacions filogenètiques entre els dos fongs mai es van clarificar (Summerbell *et al.* 1993). Berbee i Taylor (1992) van confirmar mitjançant la seqüenciació del gen 18S de l'ADN ribosòmic (ADNr) que el gènere *Ophiostoma* estava filogenèticament relacionat amb *S. schenckii*, però sense anar més enllà ja que aquest és un gen altament conservat i no permet diferenciar espècies estretament relacionades. Més tard, de Beer *et al.* (2003) van seqüenciar la regió ITS (espaiador intern de l'ADNr) incloent el gen 5.8S de l'ADNr, i va concloure que *S. schenckii* podria ser l'anamorf d'una espècie d'*Ophiostoma* però que les diferències amb *O. stenoceras* eren tan evidents que deixaven clar que eren dos fongs diferents.

La ubicació taxonòmica del gènere *Sporothrix* es detalla a la taula 1.

Taula 1. Ubicació taxonòmica del gènere *Sporothrix*

Regne	Fongs
Divisió	<i>Ascomycota</i>
Classe	<i>Sordariomycetes</i>
Ordre	<i>Ophiostomatales</i>
Família	<i>Ophiostomataceae</i>
Gènere	<i>Sporothrix</i>

Actualment *S. schenckii* inclou tot un seguit d'espècies sinonimitzades i que es detallen a continuació (<http://www.indexfungorum.org>):

- ***Racodium aeruginosum*** Pers., Observ. mycol. (Lipsiae) 2: 19 (1800) [1799]
- ***Rhinocladium asteroides*** (Splend.) Verdun, Précis Parasitol. Hum., edn 2: 678 (1913)
- ***Rhinocladium beurmannii*** (Matr. i Ramond) Vuill., Bull. Séanc. Soc. Sci. Nancy 11: 138 (1910)
- ***Rhinocladium fonsecae*** (M.J. Pereira) M.J. Pereira [as 'fonsecai'], Rev. med.-cirurg. Brasil 38: 169 (1930)

- ***Rhinocladium indicum*** (Castell.) Verdun, Précis Parasitol. Hum., edn 2: 678 (1913)
- ***Rhinocladium jeanselmei*** (Brumpt i Langeron) Verdun, Précis Parasitol. Hum., edn 2: 678 (1913)
- ***Rhinocladium schenckii*** (Hektoen i C.F. Perkins) Verdun, (1913)
- ***Rhinotrichum asteroides*** (Splend.) C.W. Dodge, Medical Mycol.: 802 (1935)
- ***Rhinotrichum beurmannii*** (Matr. i Ramond) M. Ota, Jap. J. Derm. Urol. 28: 4 (1928)
- ***Rhinotrichum indicum*** (Castell.) M. Ota, Jap. J. Derm. Urol. 27: 928 (1927)
- ***Rhinotrichum jeanselmei*** (Brumpt i Langeron) M. Ota, Jap. J. Derm. Urol. 28: 5 (1928)
- ***Rhinotrichum schenckii*** (Hektoen i C.F. Perkins) M. Ota, (1927)
- ***Sporothrix asteroides*** (Splend.) Davis, J. infect. Dis. (1913)
- ***Sporothrix beurmannii*** (Matr. i Ramond) Mey. i Aird, J. infect. Dis. (1915)
- ***Sporothrix schenckii-beurmannii*** (Greco) Mey. i Aird, J. infect. Dis. (1915)
- ***Sporotrichopsis beurmannii*** (Matr. i Ramond) Guég., Archs Parasit. 15: 104 (1911)
- ***Sporotrichum aeruginosum*** (Pers.) Pers., Mycol. eur. (Erlanga) 1: 79 (1822)
- ***Sporotrichum asteroides*** Splend., Revta Soc. scient. S. Paulo 3: 62 (1908)
- ***Sporotrichum beurmannii*** Matr. i Ramond, Compte rendu hebdomadaire des Sciences de l'Academie des sciences, Paris 2: 380 (1905)
- ***Sporotrichum beurmannii var. janselmei*** (Brumpt i Langeron) Redaelli & Cif., Le granulomatosi fungine dell 'uoumo nelle regioni tropicali e subtropicali: 458 (1942)
- ***Sporotrichum beurmannii var. schencki*** (Hektoen i C.F. Perkins) Redaelli i Cif., Le granulomatosi fungine dell 'uoumo nelle regioni tropicali e subtropicali: 455 (1942)
- ***Sporotrichum equi*** Carougeau, J. Méd. vét. zootechnol. 60: 80 (1909)
- ***Sporotrichum fonsecae*** M.J. Pereira [as 'fonsecai'], Rev. med.-cirurg. Brasil 37: 265 (1919)
- ***Sporotrichum indicum*** Castell., J. Trop. Med. Hyg. 11: 261 (1908)
- ***Sporotrichum jeanselmei*** Brumpt i Langeron, Precis Parasitol.: 889 (1910)
- ***Sporotrichum schenckii*** (Hektoen i C.F. Perkins) Beurm. i Gougerot, Archs Parasit. (1911)

- ✦ *Sporotrichum schenckii* var. *beaumannii* (Matr. i Ramond) C.W. Dodge, (1935)
- ✦ *Sporotrichum schenckii-beurmannii* Greco, Argentina Med. 45: 699 (1907)
- ✦ *Sporotrichum tropicale* Panja, Dey i Ghosh, Indian med. Gaz. 82: 202 (1947)
- ✦ *Sporotrichum verticilloides* Sartory, R. Sartory i J. Mey., Compte rendu hebdomadaire des Sciences de l'Academie des sciences, Paris (1935)
- ✦ *Trichosporum beurmannii* (Matr. i Ramond) M.L. Lutz i Splend., Annali Ig. sper. (1907)

A la vegada l'any 1969 Ajello i Kaplan van descriure la única varietat actualment coneguda d'aquesta espècie, *S. schenckii* var *luriei* Ajello i Kaplan (1969), en base a la clínica i a diferents trets morfològics (veure apartat 1.1.2).

1.1.2 Característiques morfològiques

Tal i com s'ha mencionat a l'inici de la introducció, *S. schenckii* és un fong dimòrfic. D'acord al "Dictionary of fungi" s'entén com a dimòrfic, aquell fong que té dues formes, la de llevat i la miceliar (Kirk *et al.* 2001). *S. schenckii* no és l'únic patògen que té aquesta capacitat (Howard 1961); hi ha patògens primaris per a l'home que pertanyen a diferents grups taxonòmics i que també són fongs dimòrfics, entre ells podem citar a *Histoplasma capsulatum* Darling o *Coccidioides immitis* G.W. Stiles dins els Onigenals, o *Penicillium marneffeii* Segretain als Eurotials, fins i tot algun zigomicet que com *Mucor rouxii* (Calmette) Wehmer, creix en forma de llevat en unes condicions ambientals determinades (Haidle i Storck 1966). Això fa pensar que el dimorfisme més que ser un caràcter exclusiu d'un determinat grup de fongs és una adaptació d'aquests a les diferents condicions ambientals. La fase miceliar, o també anomenada fase saprofítica, de tots aquests fongs, és la que s'acostuma a trobar a la natura creixent com a mers colonitzadors sobre diferents substrats, principalment vegetals com és el cas d'*S. schenckii*. En canvi, al trobar-se en condicions

que podríem considerar d'extremes pel fong, com és la invasió de teixit viu, aquest canvia la seva morfologia donant lloc a un creixement llevaduriform.

La **fase miceliar** d'*S. schenckii* es caracteritza per presentar hifes primes d'1.5 a 2 μm d'amplada, hialines, llises, regularment septades i ramificades, a partir de les quals es desenvolupen conidiòfors més o menys diferenciats. Aquests conidiòfors poden ser simples o ramificats, prims, a l'àpex dels quals s'hi localitzen les cèl·lules conidiògenes. Aquestes cèl·lules, inflades o no, són poliblàstiques, simpodials i denticulades; cada denticle produeix un conidi, que junts donen la imatge típica d'una margarida. Aquests conidis simpodials tenen forma de llàgrima o claviforme, i mesuren aproximadament de 2 a 4 μm de longitud i uns 2 μm d'amplada. Sovint es troben conidis solitaris creixent directament pels costats de les hifes vegetatives. Es refereix a aquests conidis com a sèssils i acostumen a ser de color marró, de paret més gruixuda i de forma variable (globosos, subglobosos, ovals, triangulars i fins i tot de forma irregular) (Fig. 1).

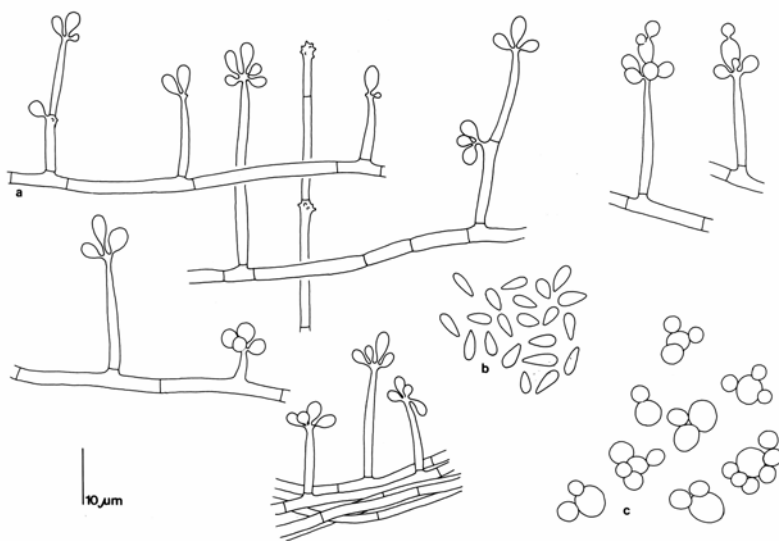


Fig. 1. *S. schenckii*. CBS 359.36. **a.** aparell conidial; **b.** conidis lliures; **c.** cèl·lules llevaduriforms produïdes in vitro a 37 °C. (de Hoog *et al.* 2000).

En els medis de cultiu que rutinàriament s'utilitzen en clínica (agar de Saboureaux, agar patata dextrosa,...) les colònies d'*S. schenckii* tenen un aspecte humit i membranós, aixecades i amb la superfície arrugada especialment al centre. A l'inici les colònies són de color blanc a cremós i, a mesura que el cultiu envellaix, es van tornant de color marró a negre (Fig. 2). A mesura que es van fent subcultius, les colònies poden perdre irreversiblement el seu color fosc, tornant-se de color cremós (Lacaz 1998).



Fig. 2. Colònies de la fase micel·liar d'*Sporothrix schenckii* en PDA als 15 dies d'incubació

La **fase llevaduriform** és la que trobem als teixits parasitats i es caracteritza per unes cèl·lules petites i allargades en forma de cigar, que mesuren $7-9 \times 1,5-2 \mu\text{m}$. En talls histològics de biòpsies de lesions, es sol observar el fenomen d'Splendore-Hoeppli, en que es veu una formació o disposició radiada dels llevats, a aquesta orientació dels elements llevaduriforms se'l coneix com a cos asteroide (Fig. 3a). Els elements parasitaris es tenyeixen de color vermell amb la tinció de PAS, i de color marró fosc o negre amb les impregnacions argèntiques de Gridley i Grocott. En els teixits animals, a més de les formes típiques de cigar es veuen també altres elements més globosos amb un brot.

La fase llevaduriform *in vitro* es pot obtenir després de fer diverses resembres del fong en medis enriquits, com el brou de cervell-cor amb

sang, incubant-lo a 37°C en agitació (Ghosh *et al.* 2002). Les colònies que es formen són blanques i cremoses. Microscòpicament apareixen elements arrodonits i en forma de cigar, iguals als trobats en els teixits (Fig. 3b).

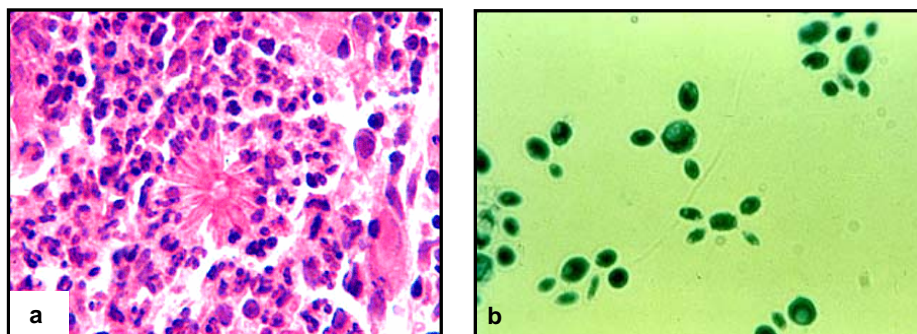


Fig. 3. fase llevaduriform d'*S. schenckii* a) *in vivo* b) *in vitro*

De les 49 espècies que actualment s'accepten en el gènere *Sporothrix* (<http://www.indexfungorum.org>), *S. inflata* de Hoog és la morfològicament més semblant a *S. schenckii* (de Hoog 1974). *S. inflata* també presenta conidis sèssils i pigmentats, però es diferencia per la presència de cèl·lules conidiògenes situades a l'àpex dels conidiòfers regularment inflades i amb nombrosos denticles (de Hoog 1974). No obstant això, si *S. schenckii* deixés de produir conidis sèssils pigmentats es podria confondre fàcilment amb altres espècies com ara *S. alba* (Petch) de Hoog o *S. curviconia* de Hoog, tot i que es diferencien per la morfologia de la colònia i dels conidis, respectivament.

S. schenckii var. *luriei* es diferencia morfològicament d'*S. schenckii* var. *schenckii* per la producció de conidis molt més llargs i prims, de 3.5 a 10 µm de longitud per 1.5 a 2 µm d'amplada. La principal diferència però es troba en la seva fase llevaduriform al teixit infectat on s'hi observen cèl·lules molt més grans que les de la varietat *schenckii*, esfèriques, normalment septades i de paret més gruixuda (Ajello i Kaplan 1969).

1.1.3 Característiques fisiològiques

L'estudi de la morfologia de les estructures microscòpiques és la tècnica més emprada per a la identificació dels fongs filamentosos, però requereix de personal altament especialitzat i, de vegades la interpretació del que es veu pot ser fins i tot complicada per l'especialista. Així que a més de les característiques morfològiques, les característiques fisiològiques, com ara la termotolerància, la capacitat de fermentar o assimilar diferents carbohidrats, compostos nitrogenats entre altres molècules, o també la capacitat de produir micotoxines, etc, han demostrat ser de gran valor diagnòstic per a la identificació d'alguns fongs, especialment per aquells que són morfològicament molt semblants (Steadham *et al.* 1986).

Existeixen pocs estudis sobre la caracterització fisiològica d'*S. schenckii* i espècies relacionades. Dos dels més recents són els realitzats per de Hoog *et al.* (2000) i Gosh *et al.* (2002). El primer va realitzar diferents proves d'assimilació de diverses fonts de carboni i de nitrogen, i de creixement a 37°C, amb un nombre reduït de soques. L'estudi realitzat per Gosh *et al.* (2002), a més de tests d'assimilació de compostos i termotolerància, inclou moltes altres proves fisiològiques (osmofília, halofília, tolerància a diferents pH, activitat ureasa, activitat fenol oxidasa, assimilació de KNO₃, hidròlisi de la caseïna, i producció de gelatinasa), però es centra en soques procedents exclusivament de la Índia. Un altre estudi on s'inclouen diverses proves fisiològiques per aquest fong i altres de relacionats va ser realitzat per Panja *et al.* (1947). En aquest estudi, a més es descriu a *Sporotrichum tropiacale* Panja, Dey & Ghosh, un fong aïllat d'una úlcera al canell d'una pacient de la Índia i que actualment es considera sinònim d'*S. schenckii* (Panja *et al.* 1947, de Hoog 1974). Alguns dels resultats obtinguts en aquest estudis es mostren a la taula 2.

Comparant aquests estudis, de les poques proves que hi ha en comú, es desprèn que existeix una gran variabilitat de resultats que podria ser

degut a la metodologia aplicada o a la diferent procedència de les soques estudiades. Qüestió ara per ara, encara sense resposta.

Taula 2. Resultats d’algunes proves fisiològiques realitzades a *S. schenckii* per de Hoog *et al.*(2000), Ghosh *et al.*(2002) i Panja *et al.*(1947)

Compost	Assimilació		Fermentació
	De Hoog <i>et al.</i>	Ghosh <i>et al.</i>	Panja <i>et al.</i>
Glucosa	+	+	+
L- ramnosa	+	v	NT
Rafinosa	v	v	-
Midó	+	-	NT
Lactosa	+	-	-
D-galactosa	+	+	+
D-xilosa	+	+	+
Sacarosa	+	+	-
Maltosa	+	+	+
α,α -trealosa	+	+	NT
Cel·lobiosa	+	+	NT
Glicerol	+	+	NT
Arabinosa	+	v	-
Dextrina	NT	v	+
Fructosa	NT	+	NT
Ribitol	NT	+	-
Mannosa	NT	+	+
D-glucitol	NT	+	-
Inositol	NT	-	-
Dulcitol	NT	-	NT
D-glucosamina	+	NT	NT
L-sorbosa	+	NT	NT
D-ribosa	+	NT	NT
Salicina	+	NT	NT
Melibiosa	-	NT	NT
Melecitosa	+	NT	NT
Meso-eritriol	+	NT	NT
D-manitol	+	NT	+
Succinat	+	NT	NT
Nitrat	+	NT	NT
Nitrit	+	NT	NT
Creatina	+	NT	NT

+ Prova positiva; - Prova negativa; V resultat variable; NT prova no testada

1.1.4 Interès en clínica

L'esperotricosi té diferents manifestacions clíniques i els investigadors difereixen en quant a la classificació de la malaltia (Lacaz *et al.* 2002). Una de les interpretacions referent a la classificació dels tipus d'esperotricosi es mostra a la taula 3.

Taula 3. Manifestacions clíniques de l'esperotricosi
(Lopes-Bezerra *et al.* 2006)

Cutània

- Limfocutania
- Fixa
- Disseminada o múltiple

Mucosa

- Ocular
- Nasal
- Altres

Extracutània

- Pulmonar
- Osteoarticular
- Meníngia
- Generalitzada

Residual (seqüela)

Formes especials

- Regressions espontànies
 - Hipersensibilitat
(eritema nodular, eritema multiform)
-

La forma clínica més freqüent (sobre el 80%) és la limfocutània. Aquesta comença amb una lesió nodular o ulcerosa al lloc d'inoculació del fong, després d'un període d'incubació de 15 a 30 dies, i segueix amb una trajectòria limfàtica caracteritzada per lesions nodulars que ulceren, fistulen i cicatritzen (Fig. 4). Aquesta descripció clínica permet anomenar a la malaltia com a "limfagitis nodular ascendent". En general, la forma fixa cutània es caracteritza per lesions nodulars infiltrades, ulcerades o eritematoescamoses localitzades en les zones on va succeir la inoculació del fong i no tendeix a la regressió espontània. La forma cutània disseminada s'ha mostrat majoritàriament entre pacients immunodeprimits, especialment en individus portadors del virus VIH (Donabedian *et al.* 1994, Shaw *et al.* 1989).

Les infeccions en mucoses no són comuns, però poden ocórrer i preferentment afecten la mucosa ocular (Vierra Dias *et al.* 1997).

Entre les formes extracutànies, les infeccions osteoarticulars i pulmonars són les més comuns. La penetració inhalatòria d'*S. schenckii* està actualment acceptada com un fet relativament freqüent en zones endèmiques. A Louisiana i Arizona (EUA), el 10% de la població aparentment sana presenta reaccions cutànies positives a l'esperotriquina. Malgrat que aquesta prova no té gran valor com a únic element indicatiu de la infecció asimptomàtica, ens demostra que cada vegada és més evident que aquest fet existeix. S'han pogut comprovar alguns casos d'esperotricosi asimptomàtica en que només es mostrava l'hili pulmonar engrandit. En subjectes d'edat mitjana, de sexe masculí, etílics o diabètics, s'acostuma a presentar la forma pulmonar crònica. Els seus signes i símptomes no són característics, i es confonen amb els de la tuberculosi pulmonar fibrocàseosa o amb els de la histoplasmosi cavitària. Els pacients presenten febrícula vespertina, pèrdua de pes, tos amb expectoració mucopurulenta, hemoptosi i dolor pleural. Aquesta forma clínica és d'evolució crònica i progressiva, es pot estendre dins del pulmó o ocasionar lesions en altres òrgans per disseminació hematògena. L'afectació pulmonar pot produir-se

també com a conseqüència de la disseminació sanguínia des d'altres focus, com succeeix en la forma d'espótricosi disseminada multifocal. L'espótricosi osteoarticular pot ser unifocal o multifocal. Aproximadament la meitat dels casos presenten només afecció a una articulació, essent la localització més freqüent al genoll, seguida per els turmells i canells; produeix sinovitis, tenosinovitis i focus d'osteomielitis i clínicament determina dolor articular, impotència funcional, tumefacció, lleuger rubor i calor, i vessament de líquid en la cavitat articular. L'afectació poliarticular, acompanyada de lesions cutànies múltiples, en forma de nòduls i tubercles, s'observa en pacients amb limfomes, trasplants d'òrgans, diabetis aguda, tractament perllongat amb corticoides, sarcoidosi i SIDA. L'espótricosi del sistema nerviós central es dona quan en pacients amb espótricosi disseminada, o en alguns sense un focus primari aparent, s'observa un procés meningoencefàlic d'evolució subaguda o crònica, amb líquid cefalorraquidi (LCR) clar; clínicament produeix mal de cap, fotofòbia, vòmits, obnubilació i rigidesa de la nuca. El LCR mostra hiperalbuminorraquia i pleocitosi amb predomini limfocitari.

En llocs on es donen molts casos d'aquesta malaltia, es poden trobar casos de regressions espontànies, i de reaccions de hipersensibilitat com els eritemes nodulars multiformes (Lopes-Bezerra *et al.* 2006).



Fig. 4. A, B, C: esporotricosi cutània. D, E, F: esporotricosi limfocutània (fotografies cedides per la Dra. Angela Ruiz)

1.1.5 Epidemiologia

L'esperotricosi ha estat molt reportada en zones tropicals i de clima temperat (Conti-Diaz 1980, Fukushima 1984, Itoh *et al.* 1986, Kwong-Chung i Bennett 1992, Eisfelder *et al.* 1993, Chakrabarti *et al.* 1994). Al sud del continent americà la malaltia és més freqüent a les tardors humides o a l'estiu (Mackinnon *et al.* 1969, Lopes *et al.* 1999), mentre que a Mèxic la major incidència s'observa durant les estacions fredes i seques (Gonzalez-Ochoa 1965). Altres autors però no han trobat cap diferència estacional (Vismer i Hull 1997, Lyon *et al.* 2003, Barros *et al.* 2004).

L'esperotricosi pot afectar a totes les edats (Rippon 1988, Vismer i Hull 1997) i el nombre de casos relacionats amb homes i dones varia segons la regió (Rippon 1988, Barros *et al.* 2004). En algunes regions la diferència en la distribució de casos segons l'edat i el sexe pot ser explicada pel tipus d'exposició al fong. Per exemple, a Brasil del 60 al 70% de casos es donen en dones, mentre que a Uruguai el 97% correspon a homes (Fukushima 1984, Kusuvara *et al.* 1988, Lyon *et al.* 2003); en canvi, en altres regions no s'ha trobat diferències entre sexes (Pappas *et al.* 2000). Generalment la infecció resulta de la inoculació traumàtica del fong a través d'espines, branques, esgarrapades, etc., que es produeixen, portant a terme activitats com floricultura, horticultura, jardineria, pesca, caça, mineria o explotacions de boscos (Mackinnon *et al.* 1969, Barros *et al.* 2003). El personal de laboratori també es pot infectar accidentalment mentre es manipulen els cultius d'*S. schenckii* (Thompson i Kaplan 1977, Cooper *et al.* 1992).

L'esperotricosi s'acostuma a donar en casos aïllats o en brots professionals. Les epidèmies són rares i si es donen estan relacionades amb una única font d'infecció (Campos *et al.* 1994, Bustamante i Campos 2001). L'epidèmia més gran que s'ha registrat mai va passar a Sud-Àfrica l'any 1940, on uns 3000 treballadors de les mines d'or van ser infectats. Es va poder establir que la infecció es produïa per microtraumatismes amb les bigues de fusta utilitzades per aguantar els túnels de la mina. L'epidèmia es

va poder controlar al tractar aquestes bigues amb antifúngics (Quintal 2000). Una altra epidèmia important va succeir l'any 1988 i va afectar 84 treballadors que participaven en programes de reforestació en 15 estats dels Estats Units. Aquesta vegada les infeccions es van associar a la molsa que es feia servir per guardar les llavors originàries de Pensilvània (Centers for Disease Control, 1988).

L'esporettriosi humana ha estat esporàdicament relacionada amb esgarrapades o mossegades d'animals (Moore i Davis 1918, Kauffman 1999), no obstant, la presència del fong a la boca o a les ungles dels animals no s'ha demostrat en cap dels casos descrits (Moore i Davis 1918, Fischman *et al.* 1973).

Des del 1980, la transmissió d'aquesta micosi de gats domèstics a l'home ha guanyat importància (Read i Sperling 1982, Dunstan *et al.* 1986 a,b, Larsson *et al.* 1989, Reed *et al.* 1993, Schubach i Schubach 2000). L'epidèmia més llarga d'esporettriosi deguda a una transmissió zoonòtica es va descriure a Rio de Janeiro (Barros *et al.* 2001), entre el 1998 i el 2004. Només a l'institut de recerca "Evandro Chagas de Fiocruz" es van diagnosticar 1503 casos d'esporettriosi a gats, 64 a gossos i 759 a humans (Barros *et al.* 2004, Shubach *et al.* 2004, 2006). Com a fet general, l'esporettriosi felina precedeix la malaltia en humans i en gossos, i la gent més freqüentment afectada inclou a mestresses de casa que tenen cura de gats infectats (Barros *et al.* 2004). El contacte amb aquests gats, dins el domicili o bé professionalment per els veterinaris, es va demostrar en un 84.1% en els casos d'esporettriosi en gossos i en un 84.7% en els casos d'humans. Entre aquests últims un 57.1% presentaven un historial d'esgarrapada o de mossegada (Lopes-Bezerra *et al.* 2006). Schubach *et al.* (2002), per investigar el potencial del gats com a possible font d'infecció, van fer un seguiment durant 2 anys de 148 gats amb sospites clíniques d'esporettriosi i 84 gats aparentment sans amb contacte domiciliari amb els gats afectats. Els animals es van sotmetre a exàmens clínics generals, amb especial atenció a la presència de lesions cutànies. El fong es va aïllar en el

100% de les lesions cutànies, en un 66.2% de frotis de les cavitats nasals, en un 41.8% de la cavitat oral i en un 39.5% de fragments del fons de les ungles de gats amb esporotricosi. *S. schenckii* també es va aïllar de la cavitat oral de tres dels gats aparentment sans. L'aïllament del fong de les ungles i de les cavitats orals dels gats reforça l'evidència que ens indica que la transmissió pot succeir a través d'esgarrapades o mossegades, mentre que l'aïllament del fong de les fosses nasals i de les lesions cutànies, ens demostra la possibilitat d'infeccions a través de secrecions tant de les mucoses com de ferides (Shubach *et al.* 2003, 2004). Els resultats del tipatge molecular d'*S. schenckii* comparant aïllats d'humans i animals suporta aquesta hipòtesi (Lopes-Bezerra *et al.* 2006).

1.1.6 Tractament

Pel tractament de l'esporotricosi s'utilitzen diferents fàrmacs, com són el iodur de potassi (IK), l'itraconazol (ITC), la terbinafina (TBF), el fluconazol (FLC) o l'amfotericina B (AMB), sols o combinats amb un tractament hipertèrmic que s'explicarà més endavant. L'elecció de la teràpia es basa en l'estat de l'individu, l'extensió i gravetat de la infecció, i la valoració de les interaccions amb altres fàrmacs i els efectes secundaris.

L'IK va ser el primer tractament que es va utilitzar amb èxit per l'esporotricosi. A Centre-Amèrica i a Sud-Amèrica, l'ús de l'IK és encara el tractament més utilitzat degut al seu baix cost. Aquest es prepara per prendre via oral com una solució saturada que conté aproximadament 1 g de iodur de potassi en 1 ml d'aigua, generalment barrejat amb llet o suc de fruites ensucrats per tal de dissimular el seu gust. L'administració s'ha de fer després de les menjades, per evitar l'aparició de gastritis. El tractament s'inicia amb cinc gotes de la solució indicada administrades tres cops al dia, i la dosi es va augmentant en una gota/dosi/dia fins a un total de 25-30 gotes, tres cops al dia. Un cop superada la infecció es recomana mantenir el tractament durant almenys 4 setmanes. Aquest tractament està indicat per

lesions localitzades (limfocutànies, cutànies fixes o mucoses). És un tractament efectiu i barat, no obstant alguns dels efectes secundaris són gust metàl·lic i la inflamació de les glàndules salivals, nàusees, hipotiroidisme i iodisme (Morris-Jones *et al.* 2003).

L'ITC s'administra oralment a la dosi de 100 a 200 mg/dia durant 3-6 mesos, amb un 90-100% d'èxit. Les indicacions són les mateixes que les descrites per a l'IK, tot i que l'ITC també s'utilitza per pacients immunodeprimits amb formes clíniques més extenses i sistèmiques.

La TBF no està autoritzada pel tractament de l'espótricosi, però s'han donat casos en que la resposta terapèutica ha tingut èxit (Hull i Vismer 1992). S'administra oralment a dosis de 250 a 500 mg/dia. Les indicacions són les mateixes que per l'ITC.

El FLC es considera un fàrmac d'eficàcia moderada pel tractament d'aquesta malaltia a conseqüència de la diferent resposta dels pacients segons el tipus d'espótricosi que pateixen. En un estudi realitzat per Kauffman *et al.* (1996) amb una dosi de FLC de 400 mg/dia es van resoldre el 71% dels casos d'espótricosi limfocutània, en canvi els casos extracutànies van mostrar un percentatge de curació molt baix (31%).

L'AMB està indicada pel tractament de les formes clíniques moderades o greus, en pacients immunodeprimits, i per aquells que no responen als medicaments descrits anteriorment. L'administració és intravenosa, amb una dosi màxima diària de 50 mg i un total de dosi acumulativa de 500 a 1000 mg. Depenent de la gravetat de la malaltia, al pacient se li ha d'administrar un altre fàrmac per via oral (Kauffman 1995).

El fet que algunes soques d'*S. schenckii* no creixin a temperatures superiors a 35°C justifica l'ús de l'aplicació de calor com una altra modalitat de teràpia per a l'espótricosi. Guants amb calor, banys d'aigua calenta (45°C aproximadament), calor sec o pomades rubefaents s'utilitzen com a teràpia complementària (Kauffman 1995, Kauffman *et al.* 2000). El tractament requereix una aplicació constant al llarg del tractament, aplicant-

se 30 minuts tres vegades al dia durant diversos mesos. Aquesta teràpia és la recomanada per a les dones embarassades, on l'ITC i l'IK estan contraindicats (Bustamante i Campos 2004).

1.2 Taxonomia molecular

D'acord al "Dictionary of fungi" s'han descrit aproximadament unes 80.000 espècies de fongs, però s'estima que n'hi ha moltes més, aproximadament, 1.5 milions (Kirk *et al.* 2001). Fins i tot però aquest últim nombre es queda curt considerant els resultats que s'estan obtenint des que s'apliquen tècniques moleculars per a l'estudi de la biodiversitat fúngica (Lutzoni *et al.* 2004).

La revolució en la taxonomia fúngica va començar a principis del 1990, amb l'anàlisi d'amplificats per PCR de gens de l'ADN ribosòmic (White *et al.* 1990). Avui en dia, la biologia molecular aplicada a l'estudi taxonòmic dels fongs ja és una disciplina àmpliament utilitzada i que, evidentment, va sorgir com una necessitat donades les limitacions de la taxonomia clàssica. Una de les limitacions més importants dels mètodes clàssics és el poder diferenciar organismes genèticament molt diferents a conseqüència de la seva semblança morfològica (espècies críptiques), el que fa que hi hagi moltes més espècies de les que realment es poden veure pel microscopi; un fet que des d'aleshores s'ha demostrat en molts fongs (Koufopanou *et al.* 2001, O'Donnell *et al.* 2004, Zhang *et al.* 2006b).

1.2.1 Concepte d'espècie

L'espècie és la unitat bàsica de la taxonomia. Des del punt de vista nomenclatural aquesta es reconeix amb un binomi llatinitzat, amb un nom genèric i l'epítet específic. De totes maneres, hi ha un gran debat sobre com s'hauria de definir a una espècie, i s'han proposat molts conceptes diferents.

Espècie morfològica és el concepte clàssic utilitzat pels micòlegs, i que defineix a un grup d'organismes com a una unitat amb característiques morfològiques idèntiques i a la vegada diferents respecte a una altra unitat o grup d'organismes. D'altra banda, per **espècie biològica** s'entén al conjunt de poblacions formades per individus que tenen el potencial de creuar-se entre ells i produir descendència fèrtil, i que es troben aïllats

d'altres grups pròxims; aquesta definició també es coneguda com a espècie sexual (Dobzhansky 1951, Mayrn 1942). Actualment, com a resultat del creixent ús de les eines moleculars, es parla molt d'**espècie filogenètica**; de manera que en lloc de tenir en compte els trets reproductius de les poblacions, es consideren les relacions genealògiques. Si un grup d'individus inclou tots els descendents d'un ancestre comú, sense deixar cap descendent fora, se'l defineix com a grup monofilètic i per tant, podria representar a una determinada espècie filogenètica. Dit d'una altra manera, el concepte d'espècie filogenètica reconeix com a espècie a qualsevol grup d'organismes en el qual tots els individus d'aquell grup comparteixen un únic caràcter derivat o apomòrfic (no present en els seus ancestres o afins) (Cracraft 1983). Cal destacar però que, si aquest concepte fos utilitzat rigorosament, poblacions ubicades properament entre sí, podrien ser considerades espècies diferents degut a que en una població hi ha variants genètiques. La clau del concepte filogenètic d'espècies és la idea de que les espècies han de ser "diagnosticables". En altres paraules, els membres d'una espècie han de compartir una combinació de característiques genètiques que altres espècies no tenen.

El concepte biològic d'espècie, principalment centrat en les diferents formes de reproducció sexual (teleomorf), conjuntament amb la morfologia ha servit de base per a l'organització taxonòmica dels fongs. Amb l'estudi de la morfologia de les formes sexuals i d'altres característiques fenotípiques, mitjançant l'observació de diferències i similituds, s'han anat caracteritzant les diverses espècies fúngiques i delimitant els diferents nivells o grups taxonòmics que coneixem. És a partir d'aquestes observacions que es van anar interpretant les relacions filogenètiques entre els membres d'aquest grup complex d'organismes eucariòtics. És complex perquè, com sabem, els fongs a més de reproduir-se sexualment, també ho poden fer asexualment; fins i tot molts d'ells tant sols es reproduïen per aquesta última via, com és el cas d'*S. schenckii*. Per tant aquests últims s'escapen del concepte estricte d'espècie biològica. Aquest fenomen ha condicionat la distribució

dels fongs asexuals (anamorfs) entre els diferents grups taxonòmics. Fins fa relativament poc temps la integració dels anamorfs en els diferents grups taxonòmics existents es basava essencialment en la similitud morfològica que podien presentar entre els anamorfs de fongs amb teleomorf conegut. En l'actualitat tot això queda resolt, o està en el camí de fer-ho, amb la biologia molecular. Les eines de la biologia molecular, a més d'ajudar al taxònom a establir les relacions anamorf-teleomorf (Gené *et al.* 1996, Mostert *et al.* 2003) i a interpretar de forma més natural les relacions filogenètiques entre els fongs (Guarro *et al.* 1999), ens permeten ubicar, en la majoria dels casos, als anamorfs entre els diferents grups taxonòmics existents, i fins i tot crear-ne de nous (Zalar *et al.* 2005). No cal insistir en el fet que, a l'igual que ha succeït amb la taxonomia bacteriana, des de que la biologia molecular s'ha aplicat a l'estudi de la taxonomia dels fongs, aquesta ha sofert canvis força dramàtics (Guarro *et al.* 1999, Kirk *et al.* 2001).

D'altra banda cal destacar que al llarg de l'evolució algunes d'aquestes espècies anamòrfiques poden haver patit un fenomen de convergència o simplificació morfològica, però també pot succeir que grups de soques d'una espècie anamòrfica determinada estiguin patint un procés de diferenciació genètica o d'especiació. Sigui el fet evolutiu que sigui, això té com a resultat que soques fúngiques amb una mateixa aparença i, probablement, sota un mateix denominador comú, un nom específic, es puguin trobar organismes molt diferents, almenys des del punt de vista genètic; és quan parlem d'**espècie críptica**. Aquest fet ha quedat ben demostrat al estudiar molecularment altres fongs anamòrfics d'interès clínic com poden ser *Scedosporium apiospermum* Sacc. ex Castell. & Chalm (Gilgado *et al.* 2005) o *C. immitis* (Koufopanou *et al.* 2001), entre altres. Per tant, la biologia molecular ens dona les eines necessàries per a poder detectar aquests fenòmens i conèixer més a fons la biodiversitat dels fongs.

1.2.2 Filogènia molecular

Per tal d'investigar l'evolució i les relacions entre els organismes, s'utilitzen diferents tipus de dades. La manera clàssica d'estimar les relacions entre espècies es comparant els seus caràcters morfològics (Linnaeus 1758). Actualment però, la informació que donen les seqüències de nucleòtids o d'aminoàcids o els polimorfismes en la longitud dels fragments de restricció (RFLP), ens permeten establir relacions filogenètiques basades en els conceptes de la selecció natural i d'evolució neutral. La utilització de les dades moleculars per construir arbres filogenètics ha guanyat interès entre els biòlegs de diferents disciplines, i sovint aquesta informació s'utilitza juntament amb els caràcters morfològics per tal de delimitar més acuradament les espècies.

La filogènia molecular té com a objectiu la reconstrucció de les relacions evolutives entre organismes comparant caràcters moleculars, principalment seqüències d'ADN. La filogènia molecular es fonamenta en la teoria de que els canvis de nucleòtids s'acumulen de manera constant en el temps. En conseqüència, les diferències entre nucleòtids que apareixen al comparar seqüències de diversos taxons aporten informació sobre el temps transcorregut des de que aquests van evolucionar a partir d'un ancestors comú. D'aquesta manera s'infereix la distància genètica que relaciona a un organisme amb el seu ancestors (Vandamme 2003).

Els arbres evolutius són les estructures necessàries per entendre les diferències genètiques entre espècies i per analitzar aquestes diferències estadísticament. Un arbre es compon d'una sèrie de nodes connectats per branques o eixos (Fig. 5). Existeixen nodes terminals (taxons terminals) i nodes interns. Els primers són els organismes dels quals tenim la informació (seqüències, etc...), mentre que els nodes interns representen els ancestors hipotètics. L'ancestors de tots els nodes terminals que formen l'arbre és l'arrel del mateix.

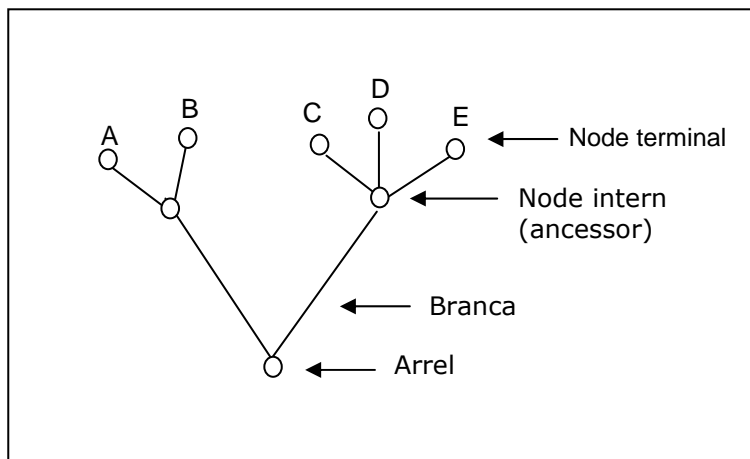


Fig. 5. Esquema d'un arbre filogenètic. A-E, seqüències dels organismes en estudi (adaptat de Berbee i Taylor 1999).

Segons la teoria de l'evolució, tots els organismes provenen d'un ancessor comú (Darwin 1859). Hi ha diferents mecanismes que han intervingut per adquirir variacions genètiques i que ens han portat a la biodiversitat actual. Aquests mecanismes inclouen mutacions puntuals, recombinacions, duplicacions de gens, reorganització de genomes, translocacions, transferència gènica, insercions, delecions i duplicacions; de totes aquestes possibilitats, només les mutacions (mutacions puntuals, insercions i delecions) s'utilitzen en els diferents mètodes de filogènia molecular per a trobar relacions entre gens de diferents organismes. Per a realitzar aquestes anàlisis filogenètiques, es considera la similitud dels gens, assumint que són homòlegs (Vandamme 2003). El terme homologia s'utilitza només quan l'ancessor comú és el suficientment recent per a que la seqüència d'un gen retengui la suficient similitud per a poder ser utilitzada en l'anàlisi filogenètica. Malgrat que s'assumeix que tots els organismes provenen d'un avantpassat comú, al llarg del temps la similitud entre dos gens pot haver variat tant que les seves seqüències no aportin la suficient informació per relacionar-los. Per tant, els gens són homòlegs o no ho són,

però no podem parlar de tant per cent d'homologia entre gens, sinó de tant per cent de similitud.

Comparant gens d'espècies estretament relacionades s'ha vist que normalment només difereixen un de l'altre en un nombre limitat de mutacions puntuals, és a dir, en un nombre limitat de substitucions nucleotídiques. Aquests canvis normalment es troben a la tercera posició del codó dels ORFs (marcs de lectura oberts), degut a que la tercera posició del codó té una taxa d'evolució més ràpida que les altres dues posicions. Alguns gens estan més conservats que altres; les espècies poc relacionades, sovint només tenen seqüències similars en els gens que codifiquen enzims o proteïnes estructurals. Aquestes similituds però, quan es troben, poden involucrar només petits segments que a la vegada es poden trobar barrejats amb regions de longitud variable sense similitud, la qual cosa ens indica que hi ha hagut moltes mutacions (Vandamme 2003).

Les anàlisis filogenètiques estimen les relacions entre gens o fragments de gens deduint la història comú d'aquests. Per a fer això, és essencial comparar llocs homòlegs i realitzar l'alineament de les seves seqüències. Obtenir alineaments correctes és senzill per a espècies estretament relacionades; es una feina que es pot fer manualment amb un processador de text, però com més llunyanes són les espècies aquesta feina es complica molt més. Per això freqüentment es construeixen alineaments amb paquets de software específics, que utilitzen algoritmes particulars.

1.2.3 Mètodes filogenètics

Els mètodes dissenyats per inferir filogènia pretenen ser models de processos evolutius que permetin reconstruir les relacions evolutives entre un grup d'organismes. Els mètodes filogenètics basats en seqüències d'ADN es poden diferenciar en dos grups: els mètodes basats en distàncies genètiques i els mètodes basats en caràcters conservats.

Els mètodes basats en distàncies genètiques parteixen del supòsit de que la distància entre dos taxons (definida com la mesura de la seva similitud) es relaciona directament amb la seva relació filogenètica. Aquestes distàncies es reconstrueixen mitjançant la comparació de parells de seqüències, per a les quals es calcula un índex que expressa les diferències observades entre els seus nucleòtids. Amb les distàncies calculades s'elabora una matriu a partir de la qual es construeix un arbre filogenètic. Un dels mètodes més estès basat en distàncies genètiques és el de *Neighbour-Joining* (NJ) o veí més pròxim (Saitou i Nei 1987). Els arbres que s'obtenen amb aquest mètode formen agrupaments amb les seqüències que posseeixen menor distància genètica, seguint el principi de la mínima evolució proposat per Saitou i Imanishi (1989) en que es dedueixen les longituds de l'arbre tenint en compte les distàncies genètiques en lloc de considerar les substitucions nucleotídiques (Rzhetsky i Nei 1992, 1993, Kumar 1996). L'avantatge més significativa de NJ és la rapidesa en el processament de les dades, el que el converteix en un dels mètodes més utilitzats per inferir filogenia. A més, resulta molt resolutiu quan les distàncies són curtes i les seqüències que disposem són llargues. Entre les seves principals desavantatges podem citar que només mostra un únic arbre, desestima les distàncies genètiques llargues i és especialment susceptible als fenòmens d'homoplasia (canvi evolutiu paral·lel que fa que dos organismes presentin un mateix caràcter adquirit independentment).

El mètode basat en caràcters conservats més utilitzat és el mètode de màxima parsimònia (MP) (Czelusniak *et al.* 1990; Swofford i Olsen 1990). En aquest mètode es considera cada posició nucleotídica com un caràcter independent. Per tant, com més llargues són les seqüències que comparem, hi haurà un major nombre de caràcters, i s'obtindrà més informació. Aquests tipus de mètodes, a partir de l'alineament de les seqüències, avaluen els canvis que s'han donat en cada posició nucleotídica entre les diferents seqüències, i estableixen les possibles relacions filogenètiques (DeSalle *et al.* 1994). A diferència dels mètodes basats en distàncies

genètiques, els mètodes basats en caràcters conservats utilitzen tota la informació continguda en la seqüència. El mètode MP calcula el nombre de canvis evolutius que requereix cada un dels possibles arbres. A aquest nombre se'l considera com la longitud de l'arbre. De tots els arbres possibles es selecciona el que requereix un menor nombre de canvis (l'arbre de menor longitud). Una vegada obtingut l'arbre, és necessari determinar el grau de fiabilitat d'aquest. Existeixen diferents mètodes per determinar la fiabilitat, essent el més utilitzat l'anàlisi de *bootstrap* (Feldestein 1985, Hillis i Bull 1993). Aquest mètode es basa en generar un nombre elevat de pseudo-rèpliques de la matriu original de dades. L'algoritme retalla les dades de la matriu per columnes, les quals són seleccionades posteriorment a l'atzar per construir una rèplica de la mateixa mida que la original. Aquest procés es repeteix entre 100 i 1000 vegades. Per a cada matriu obtinguda es genera un arbre nou i finalment es reconstrueix l'arbre òptim. El resultat final, l'índex de *bootstrap*, representa la freqüència de conservació de cada branca en el total dels arbres rèplica. Es considera que un valor superior al 75% indica un bon suport estadístic per una branca determinada.

Indiscutiblement, els mètodes basats en distàncies genètiques i en caràcters conservats han estat els més extensos per inferir filogènia, però cap d'ells resulta absolutament avantatjós. Un mètode pot ser més o menys resolutiu en funció del tipus de dades. En conseqüència, és essencial conèixer els principis bàsics de la inferència filogenètica per així escollir el procediment més adequat i interpretar els resultats considerant les seves limitacions. En resum, la inferència filogenètica es basa en un conjunt de models matemàtics cimentats en certs postulats evolutius, i que es troben en continu perfeccionament.

1.2.4 Gens estudiats en la construcció d'arbres filogenètics

Les seqüències més utilitzades en els estudis filogenètics dels fongs són les corresponents als gens que codifiquen els diferents ADNr agrupats en

tàndem i formant unitats de transcripció que es repeteixen al llarg del genoma entre 100 i 200 vegades. Existeixen dos unitats transcripcionals que són adjacents però que es transcriuen separatament. Una d'aquestes unitats està formada pel gen que codifica l'ADNr 5S i l'altra unitat transcripcional està formada pels gens ribosòmics 18S, 5.8S i 28S, i per dos espais intergènics (ITS1 i ITS2) i dos espais externs (ETS). A més, aquestes dues unitats codificants estan separades pels espais intergènics (IGS) (Fig. 6).



Fig.6 Esquema de l'organització dels gens ribosòmics en eucariotes

Els gens 18S, 5.8S i 28S donen lloc a les formes estructurals dels ribosomes i són essencials per a la síntesi de proteïnes. Aquests gens són altament conservats i estan presents en tots els organismes eucariotes, permetent comparacions filogenètiques entre dominis i regnes. El fragment que comprèn els ITS i el gen 5.8S (560 pb) s'ha utilitzat força per demostrar diferències entre espècies, tant d'ascomicets com d'hifomicets (Cano *et al.* 2002, García *et al.* 2004, Gilgado *et al.* 2005). El gen 18S (subunitat petita o SSU) (1800 pb) té una funció crucial en el procés de síntesi de les proteïnes i malgrat el seu alt grau de conservació, els seus dominis variables han estat vàlids per establir relacions a nivells supraordinals dins el regne dels fongs, així com la relació d'aquest amb altres regnes (Suh i Blackwell 1999, Berbee i Taylor 2001). No obstant, aquest gen no ha permès aclarir nombroses incògnites dins la taxonomia dels ascomicets (Tehler *et al.* 2000). El gen 28S (subunitat gran o LSU) (3400 pb) tot i estar molt conservat posseeix regions més variables que d'altres (D1/D2). Aquests

dominis variables han estat utilitzats per inferir filogènia a diferents nivells taxonòmics (Bills *et al.* 2002, Huzefa *et al.* 2003), encara que en espècies morfològicament molt relacionades, no són sempre resolutius (Hennequin *et al.* 1999). A diferència dels gens, els espaiadors ITS1 i ITS2 mostren una major variabilitat i sovint s'utilitzen taxonòmicament per conèixer la relació existent entre els fongs a nivell de gènere o espècie. No obstant això, diversos autors consideren que els ITS són regions polimòrfiques que poden crear confusions filogenètiques (Berbee i Taylor 2001; Kwan i Hack 2002).

Per tal de trobar les relacions entre els fongs, seria de gran utilitat conèixer les seqüències complertes dels tres gens de l'ADNr. Això però, és difícil d'aconseguir degut al cost de la seqüenciació i al temps que s'hauria d'invertir per a fer-la. Per la qual cosa, generalment només es troben disponibles les seqüències complertes dels gens 5.8S, amb els ITSs, i 18S, que són més curtes que les del gen 28S.

Encara que les seqüències complertes de l'ADNr es trobessin disponibles per tots els fongs, probablement no ens donarien tota la informació necessària per a respondre a totes les qüestions sobre les relacions entre aquests. Malgrat que el nombre de nucleòtids en les repeticions ribosòmiques és substancial (sobre uns 9000 pb), el nombre de possibles caràcters útils per a qüestions específiques sovint és petit.

Per aconseguir un punt de vista més ampli en les relacions evolutives entre els fongs es recomana estudiar altres regions genòmiques. Les seqüències de proteïnes ofereixen avantatges respecte a les de l'ADNr, com ara que els grans canvis produïts per insercions i delecions són infreqüents, ja que sovint porten a patrons de lectura erronis, i per tant la seva eliminació a través de la selecció natural. Els genomes eucariòtics ofereixen un ampli ventall de gens codificants de proteïnes per a les anàlisis filogenètiques. No obstant, la utilització d'aquests gens per estudis de filogènia han de superar alguns obstacles, com és el disseny dels primers. Degut a que en els gens codificants per proteïnes la selecció actua a nivell

d'aminoàcid, diferents triplets d'ADN poden codificar per el mateix aminoàcid, per tant un cebador que funciona per un fong, pot no fer-ho per un altre molt relacionat, a conseqüència de que les substitucions han canviat el lloc d'unió del cebador a l'ADN, sense canviar però la seqüència d'aminoàcids. Aquest problema sovint es pot resoldre utilitzant primers degenerats, que consisteixen en seqüències mixtes que complementen diverses dianes de la seqüència patró.

S'han seqüenciat gens que codifiquen per proteïnes com la calmodulina, el factor d'elongació, la quitina sintasa, i la tubulina entre altres i s'han utilitzat per resoldre problemes taxonòmics en diferents grups de fongs (Liu *et al.* 1999, Gilgado *et al.* 2005, O'Donnell *et al.* 2007).

La **calmodulina** (Fig. 7) és una proteïna ubiqua d'unió al calci que actua de mediador dels ions calci en nombrosos sistemes biològics. Es troba en totes les cèl·lules eucariotes i realitza la seva acció a través d'una sèrie de proteïnes quinases dependents d'ella.

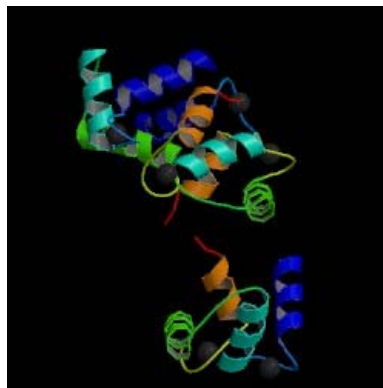


Fig. 7. Representació tridimensional de la Calmodulina, treta de la base de dades del *Expaty Proteomics Server* (www.expasy.org)

La **quitina sintasa** és l'enzim responsable de la síntesi de la quitina, un polisacàrid que proporciona a les estructures que el posseeixen gran resistència mecànica. A la paret dels fongs la quitina es troba en forma de microfibrilles, formades per l'associació d'un nombre variable de cadenes de polisacàrids, disposades de forma antiparal·lela i associades per ponts d'hidrogen. Des del punt de vista bioquímic, la síntesi de la quitina ocorre per la transferència d'un radical glicosil a partir d'un donador a un acceptor que és la cadena naixent del polisacàrid. No coneixem la seva estructura ni el seu lloc actiu ja que mai s'ha pogut aïllar aquest enzim actiu.

La **tubulina** (Fig. 8) és una proteïna polar globular amb una seqüència d'aminoàcids altament conservada evolutivament. La tubulina és la unitat estructural bàsica que forma els microtúbuls, un dels principals components del citoesquelet cel·lular. Per a la generació d'un microtúbul es requereix la gamma tubulina que rodeja el centrosoma, i serveix de motlle per a la subseqüent associació dels dímers d'alfa i beta tubulina, generant-se així el microtúbul creixent.



Fig. 8 Representació tridimensional del dímer d'alfa i beta tubulina, treta de la base de dades del *ExPASy Proteomics Server* (www.expasy.org)

El **factor d'elongació** (Fig. 9) és una proteïna que es troba al citoplasma i que intervé en la fase de traducció durant el creixement de la cadena polipeptídica.



Fig. 9 Representació tridimensional del factor d'elongació 1- α , treta de la base de dades del *ExPASy Proteomics Server* (www.expasy.org)

Darrerament, la gran majoria d'estudis taxonòmics aplicats a fongs es fan a partir d'una anàlisi multigènica, on es combina la informació d'un mínim de 3 gens (locus), entre els quals freqüentment s'utilitzen els explicats anteriorment (O'Donnell *et al.* 1998, Liu *et al.* 1999, Gilgado *et al.* 2005). Aquests estudis filogenètics multilocus en general són una eina ideal per evitar interpretacions errònies en les anàlisis (Lutzoni *et al.* 2004).

1.3 Sensibilitat antifúngica

El terme antibiòtic, antifúngic o antimicòtic inclou totes aquelles substàncies que poden produir modificacions en les estructures bàsiques de la cèl·lula fúngica inhibint el seu desenvolupament o alterant la seva viabilitat i produint les mínimes alteracions de la cèl·lula hoste (Kerridge i Vanden-Bossche 1990).

L'estudi de la sensibilitat *in vitro* dels fongs als agents antifúngics utilitza mètodes i tècniques similars a les dels antibacterians, i el seu disseny segueix les mateixes directrius (Espinell-Ingroff i Shadomy 1989, Shadomy i Shadomy 1991). La tècnica més utilitzada pels fongs filamentosos és la dilució en medi líquid també coneguda com a micromètode, encara que per alguns fongs de creixement molt lent com els dermatofits es segueix utilitzant el mètode de difusió en agar (Shadomy *et al.* 1991). Mitjançant aquestes tècniques es pot quantificar l'activitat de l'antifúngic, expressada com la concentració mínima inhibidora (CMI) o la concentració mínima letal (CML). Així es pot avaluar la sensibilitat *in vitro* d'un fong a un o més antifúngics, la correlació d'aquests resultats amb l'activitat dels fàrmacs en estudis *in vivo* i predir el pronòstic terapèutic. És útil també per detectar el desenvolupament de soques resistents i determinar el potencial valor terapèutic d'un nou agent antifúngic (Espinell-Ingroff 1994).

L'any 1982 el NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*), actualment conegut com CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) va crear un subcomité per a l'estandardització de les proves de sensibilitat als antifúngics. El principal objectiu va ser tractar d'unificar els criteris metodològics, primer amb els llevats i més tard amb els fongs filamentosos, amb la finalitat d'establir correlacions entre els resultats obtinguts al laboratori i en clínica. Després de diverses publicacions preliminars, al 2002 es va publicar el document M27-A2 (NCCLS 2002) per a l'assaig d'antifúngics amb llevats i el M38-A (NCCLS 2002) pels fongs

filamentosos. Ambdós documents proposen un mètode de microdilució en medi líquid i estableixen les variables experimentals crítiques pels assajos *in vitro*. Descriuen la preparació de l'inòcul, el medi de cultiu, les temperatures i temps d'incubació més adequats, així com els criteris de lectura. Des de la seva aparició, els protocols establerts pel CLSI, han estat acceptats universalment com a mètode de referència per a l'assaig de l'activitat *in vitro* dels antifúngics, però presenta certes limitacions. En aquest sentit podem destacar que fa referència a un nombre molt limitat de gèneres de fongs filamentosos (*Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Rhizopus* spp., *Pseudallescheria boydii* i la forma miceliar d'*S. schenckii*), sense mencionar altres espècies també importants des del punt de vista clínic, com són els dermatofits, altres fongs dimòrfics o altres espècies de fongs miceliars oportunistes d'importància clínica. A més, tan sols es centra en assaig *in vitro* de l'amfotericina B, la 5-fluorocitosina i dels azols, sense fer menció a nous compostos que actualment es troben en fase de desenvolupament com són les equinocandines i les alilamines.

Hi ha relativament pocs estudis sobre la sensibilitat *in vitro* d'*S. schenckii* als antifúngics (Johnson *et al.* 1998, Espinel-Ingroff *et al.* 2001, Gonzalez *et al.* 2005, Trilles *et al.* 2005, Alvarado-Ramirez i Torres-Rodriguez 2007). La majoria d'aquests han treballat amb un nombre molt limitat de soques i comparant l'activitat de pocs antifúngics. En general, tots ells destaquen l'eficàcia de la terbinafina i del ketoconazol, vers els resultats variables en altres antifúngics com ara l'itraconazol. Alguns autors fins i tot han detectat diferències segons l'origen de la soca estudiada i el tipus d'infecció que produïen (Johnson *et al.* 1998, McGinnis *et al.* 2001, Trilles *et al.* 2005).

Alguns treballs (Trilles *et al.* 2005, Kohler *et al.* 2006) han comparat fins i tot el comportament *in vitro* de la forma miceliar i de la llevaduriform d'*S. schenckii* vers diferents antifúngics, veient en general que la forma miceliar és la que mostra CMIs més elevades.

1.4 Estudis de patogenicitat

Els estudis de patogenicitat són indispensables en el camp de la recerca de les infeccions ja que a més de permetre'ns demostrar, mitjançant experimentació animal, si un microorganisme és capaç de produir una infecció en un hoste sensible, ens permet conèixer fins i tot el seu grau de virulència, obtenint detalls de l'abast de la infecció i de les estructures que desenvolupa per envair el teixit hoste. En el cas d'*S. schenckii*, ja des de la publicació dels primers casos, amb l'aïllament de les primeres soques, es descriu detalladament quins són els efectes d'inocular aquest patogen humà en diferents animals d'experimentació (Hektoen i Perkins, 1900). Ja aleshores es posà de manifest que, tot i fent servir el mateix inòcul, la sensibilitat a la infecció era diferent segons l'animal utilitzat i també segons el lloc on es duia a terme la inoculació en un mateix tipus d'animal. Això sí, el que sempre es veia en els exàmens microscòpics de les mostres obtingudes dels animals i en teixit humà infectats era la presència de cèl·lules allargades, d'uns 2-4 µm de longitud, algunes d'elles fins i tot en procés de gemmació, demostrant llavors el caràcter dimòrfic d'aquest fong. El fet de la diferent sensibilitat segons el model animal utilitzat (cobais, conills, ratolins, gossos,...) ha quedat palès en estudis posteriors (Mackinnon *et al.* 1964, Dixon *et al.* 1992, Tachibana *et al.* 2001), el que ha conduït a intentar conèixer millor la seva patogènia i els possibles factors de virulència que poden afavorir l'establiment de la infecció.

En aquest sentit, diversos estudis demostren que el grau de virulència d'aquest patògen està relacionat amb la termotolerància, la longevitat dels conidis o la seva pigmentació. Soques d'*S. schenckii* que causen malaltia visceral o limfonodular creixen a 37°C, mentre que altres soques menys termotolerants tendeixen a ser menys invasives i causen lesions cutànies fixes (Mackinnon i Conti-Diaz 1962, Mackinnon *et al.* 1964, Mackinnon *et al.* 1969, Kwon-Chung i Bennet 1992). Fernandes *et al.* (1999), utilitzant com a model animal el ratolí, observaren que els conidis de 4 dies eren més

virulents que aquells de 10-12 dies. I també, diferents estudis posen de manifest que les soques d'*S. schenckii* que produeixen conidis pigmentats són més patògenes respecte a les soques que no els produeixen (Howard i Orr 1963, Mackinnon *et al.* 1970, Dixon *et al.* 1991, Mesa-Arango *et al.* 2002). De fet la melanina s'ha descrit com un factor de virulència important en altres fongs patògens humans com és el cas de *Cryptococcus neoformans* (San Felice) Vuill (Romero-Martinez *et al.* 2000). Darrerament s'han realitzat diversos estudis per tal de relacionar la virulència d'aquest patògen amb les diferents manifestacions clíniques que es coneixen i els diferents genotips que mostren les seves soques, però cap d'ells ha aconseguit resultats concloents.

Per tant, s'entreveu que encara queda molta feina per a fer en aquest camp i esperem que els actuals estudis moleculars que es realitzen vers aquesta espècie ens donin llum per avançar en el coneixement de la seva patologia.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
FILOGÈNIA MOLECULAR I CARACTERITZACIÓ FENOTÍPICA DEL COMPLEX D'ESPÈCIES DE
SPOROTHRIX SCHENCKII
Rita Marimón Picó
ISBN: 978-84-691-1554-1 /DL:T.147-2008

2. INTERÈS DEL TREBALL I OBJECTIUS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

FILOGÈNIA MOLECULAR I CARACTERITZACIÓ FENOTÍPICA DEL COMPLEX D'ESPÈCIES DE
SPOROTHRIX SCHENCKII

Rita Marimón Picó

ISBN: 978-84-691-1554-1 /DL:T.147-2008

2. INTERÈS DEL TREBALL I OBJECTIUS

Per tal de tractar adequadament una infecció és fonamental la identificació correcta de l'espècie involucrada. Les soques que s'aïllen d'*S. schenckii* tant d'origen clínic com ambiental, presenten una sèrie de trets morfològics que faciliten el seu reconeixement. Però tot i que existeix una extensa literatura sobre aquest patògen humà, tant des del punt de vista clínic com taxonòmic, les darreres publicacions fan pensar que no es coneix tan bé com es creia. En els darrers anys, diferents estudis moleculars (Ishizaki *et al.*, 1998, 2002, Mesa-Arango *et al.* 2002.) posen de manifest que, sota una mateixa aparença, hi ha individus genèticament força diferents, fet que indica la possibilitat que *S. schenckii* en realitat estigui constituït per un complex d'espècies críptiques. Confirmar aquest fet, sens dubte, capgiraria els coneixements que fins al moment es tenen vers aquest patògen. El mer fet de demostrar l'existència d'espècies diferents ens obre un ventall de possibilitats, com ara intentar relacionar-les amb les diferents manifestacions clíniques d'esporetricosi que es coneix o, entre altres coses, esbrinar si presenten diferent sensibilitat antifúngica. Tot plegat ens permetria avançar en el coneixement d'aquestes infeccions i sens dubte, ens oferiria la possibilitat de millorar el seu tractament.

Es per tot això que l'**OBJECTIU GENERAL** d'aquesta tesi és:

Determinar, utilitzant diferents marcadors moleculars, si *S. schenckii* presenta la suficient variabilitat genètica com per considerar l'existència de diferents espècies filogenètiques, i, si fos així, intentar realitzar la seva caracterització fenotípica amb la finalitat de facilitar el reconeixement pel diagnòstic clínic o altres estudis relacionats.

Per aconseguir l'objectiu general indicat haurem d'acomplir els següents
OBJECTIUS ESPECÍFICS:

1. Reunir un nombre important de soques identificades com *S. schenckii*, tant d'origen clínic com ambiental així com de diferents orígens geogràfics.
2. Realitzar un anàlisi de seqüenciació multigènic i de filogènia per a determinar quins són els marcadors genètics més adequats per delimitar espècies filogenètiques en el conjunt de soques identificades morfològicament com *S. schenckii*.
3. Caracteritzar morfològicament i fisiològicament les espècies filogenètiques detectades.
4. Determinar la sensibilitat *in vitro* als antifúngics, tant dels tradicionals com dels nous, de les diferents espècies filogenètiques.
5. Avaluar la patogenicitat de les espècies filogenètiques en un model murí.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
FILOGÈNIA MOLECULAR I CARACTERITZACIÓ FENOTÍPICA DEL COMPLEX D'ESPÈCIES DE
SPOROTHRIX SCHENCKII
Rita Marimón Picó
ISBN: 978-84-691-1554-1 /DL:T.147-2008

3. MATERIALS I MÈTODES

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

FILOGÈNIA MOLECULAR I CARACTERITZACIÓ FENOTÍPICA DEL COMPLEX D'ESPÈCIES DE
SPOROTHRIX SCHENCKII

Rita Marimón Picó

ISBN: 978-84-691-1554-1 /DL:T.147-2008

3. MATERIALS I MÈTODES

3.1 Soques utilitzades. Conservació

Per realitzar la present tesi s'han utilitzat cent quaranta-dos soques inicialment identificades com a *S. schenckii* (114 d'origen clínic i 28 d'origen ambiental). Totes les soques d'origen clínic eren de mostres humanes. L'origen de les soques es detalla a l'annex 1.

3.1.1 Origen i activació de mostres per a l'obtenció de soques ambientals

Es va treballar amb mostres de terra conservades a 4°C a la càmera refrigerada, recol·lectades en diferents orígens geogràfics (Austràlia, Espanya, Mèxic, Argentina, Cuba i Nigèria).

Per l'aïllament de soques d'*S. schenckii*, aproximadament 1g de terra s'introduïa en un tub d'assaig de 10 ml, i se li afegien 9 ml d'aigua destil·lada estèril, es barrejava vigorosament i es deixava sedimentar 5 minuts, finalment es sembraven 450 µl del sobrenadant per duplicat en plaques de Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC), amb un suplement del 0,1% de cicloheximida, i s'incubava a 25°C. Els cultius s'observaven regularment mitjançant l'ús d'un microscopi estereoscòpic per tal de detectar les colònies d'*S. schenckii*, durant almenys 60 dies.

3.1.2 Aïllament i obtenció de cultius purs

Una vegada es reconeixien possibles colònies d'*S. schenckii*, es realitzaven preparacions microscòpiques amb lactofenol per a confirmar la seva identificació i seguidament es procedia al seu aïllament. Per fer l'aïllament i obtenció de cultius purs, s'agafaven conidis amb l'ajuda d'una agulla hipodèrmica i s'inoculaven en plaques de petri que contenien agar de

patata dextrosa (PDA) o Agar de farina de morenc (CMA). Les plaques es retolaven pertinentment i s'incubaven a les mateixes condicions que les plaques d'activació de la mostra.

3.1.3 Conservació dels cultius

Totes les soques tant les d'origen clínic com ambiental, rebien un numero de col·lecció precedit de les sigles FMR (Facultat de Medicina de Reus). Els aïllats es guardaven en PDA a 4-7°C i conservats en tubs d'agar inclinat amb oli vegetal. Primerament l'oli es dispensa en ampolles Pyrex, preferentment de 100 ml i s'esterilitzava 3 vegades en dies alternats. Es feien cultius, en tubs inclinats de CMA i agar de patata i pastanaga (PCA), quan el fong estava ben crescut i esporulat afegíem l'oli fins a cobrir per complet la llengüeta de l'agar, d'aquesta manera evitàvem que s'assequés el medi de cultiu i el fong. També es van fer liofilitzats de totes les soques per tal d'assegurar la seva conservació. Tant els holotips com els cultius vius de les soques d'interès es van dipositar en col·leccions internacionals de cultius com a l'International Mycological Institute, Bakeham Lane, Egham, Surrey, Anglaterra (IMI), Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Holanda (CBS) i al Culture Collection of the Scientific Institut of Public Health, Brussel·les, Bèlgica (BCCM/IHEM).

3.2 Estudis morfològics

Per a realitzar una caracterització més detallada de totes les soques es procedia en primer lloc al seu estudi morfològic, realitzant un primer estudi macroscòpic de les característiques de les colònies i posteriorment l'estudi morfològic de les seves característiques microscòpiques.

3.2.1 Estudis culturals

Per a la caracterització macroscòpica de les colònies es van utilitzar diferents medis de cultius, PDA, CMA i agar farina de civada (OA). Les soques es van incubar a 30°C al ser la temperatura que millor es desenvolupa aquest fong. Les característiques macroscòpiques de les colònies s'obtenien als 14 i 21 dies des de la seva inoculació. Les principals característiques culturals que s'anotaven eren:

- Color de la superfície i del revers (Kornerup i Wanscher 1984).
- Textura (cotonosa, pulverulenta, granulada, vellutada,...)
- Topografia (llisa, rugosa, radiada, plana, elevada,...)
- Marges (fimbriats, sencers,...)
- Taxa de creixement diari (diàmetre de les colònies als 14 i 21 dies)

3.2.2 Estudis microscòpics

Les soques es van examinar fent servir els microscopis Olympus CH2 i Olympus BH2. El sistema que es va utilitzar per realitzar les microfotografies va ser una càmera digital Olympus DP10 acoblada a un microscopi Leitz

Dialux 20. El sistema de captació i processament d'imatges es va fer amb el programa "*Analysis*" (Soft Image System GmbH, Alemanya).

Es va utilitzar l'òptica de contrast de fases, principalment, per a l'observació de les diferents característiques microscòpiques, i la de camp clar per a l'obtenció de les mides de les diferents estructures.

Les estructures microscòpiques que principalment es varen examinar van ser:

- Hifes: color, forma i diàmetre
- Estructures de l'aparell conidial
- Conidis: tipus, color, mida, forma, disposició
- Tipus de conidiogènesi
- ...

3.2.2.1 Preparació directa

Amb una agulla hipodèrmica estèril recollíem una porció de la colònia i es dipositava en un portaobjectes al que prèviament se li havia col·locat una gota de lactofenol. Després es dipositava un cubreobjectes i es procedia a l'estudi microscòpic de la preparació. La preparació directa es realitzava per la identificació presumptiva de les soques i per la presa de mesures de les diferents estructures. Però a conseqüència de la fragilitat del fong, la majoria de característiques microscòpiques van ser examinades a partir de la tècnica de microcultiu.

3.2.2.2 Microcultiu

Aquesta tècnica permet que el fong creixi directament sobre la superfície del cubreobjectes de manera que una vegada muntat sobre un

portaobjectes es pugui examinar el fong amb una mínima alteració de les seves estructures.

El procediment era el següent: d'una placa de CMA es tallaven asèpticament blocs de 1 cm² i es col·locaven sobre el medi de la mateixa, s'inoculaven les quatre arestes superiors de cada un dels blocs i es dipositava un cubreobjectes estèril al damunt (Fig. 10). La placa es posava a incubar a 30°C i entre els 8 i 12 dies, quan s'observava que el fong havia esporulat, es feien preparacions, separant amb cura el cubreobjectes del bloc d'agar, dipositant-lo sobre un portaobjectes utilitzant com a líquid de muntatge lactofenol amb unes gotes d'alcohol polivinil (PVA).

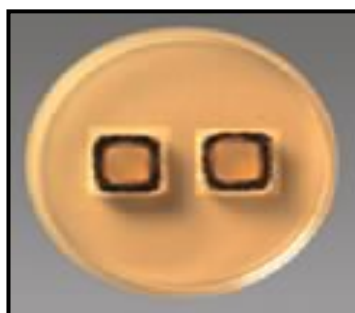


Fig. 10 Fotografia d'un microcultiu

3.2.3 Medis de cultiu i de muntatge

En aquest apartat es descriuen els medis de cultiu utilitzats per a l'estudi de les diferents soques de *S. schenckii* i per a l'obtenció d'aïllaments de soques del terra. També s'especifiquen els medis de muntatge més comunament utilitzats per a l'obtenció de preparacions temporals, per la identificació presumptiva del fong, i de preparacions permanents per als estudis microscòpics exhaustius.

3.2.3.1 Medis de cultiu

🍄 Agar farina de moresc (**CMA**)

Moresc trinxat	30 g
Agar	15 g
Aigua destil·lada	1000 ml

Es col·locava en un recipient apropiat el moresc trinxat i 500 ml d'aigua, i s'escalfava fins a bullir durant aproximadament 1 hora. Es filtrava i se li addicionava l'agar i la resta d'aigua. Es dispensava en pots de vidre i s'esterilitzava durant 20 minuts a 121 °C

🍄 Agar farina de civada (**OA**)

Farina de civada	30 g
SO ₄ Mg.7H ₂ O	1 g
PO ₄ H ₂ K	1.5 g
Agar	15 g
Aigua destil·lada	1000 ml

Es bullia la farina de civada durant 1h 40 min, es filtrava la solució resultant i se li addicionava l'agar i la resta d'aigua. Es dispensava en pots de vidre i s'esterilitzava durant 20 minuts a 121 °C.

🍄 Agar patata dextrosa (**PDA**)

PDA (Difco)	39 g
Aigua destil·lada	1000 ml

Es dissolia el preparat de PDA de la casa comercial Difco i s'esterilitzava durant 20 minuts a 121 °C.

✦ Agar patata pastanaga (**PCA**) (Hawksworth *et al.* 1995):

Infusió de patata	20 g
Infusió de pastanaga	20 g
Agar	15 g
Aigua destil·lada	1000 ml

Es tallaven les patates i les pastanagues a trocets i es col·locaven en un recipient apropiat amb l'aigua, es portava a ebullició i es mantenia durant 1 hora i 40 minuts, es filtrava a través de gasses i es desestimava el residu sòlid. Es dispensava en pots de vidre, s'hi afegia l'agar i s'enrasava a la quantitat necessària i s'esterilitzava durant 20 minuts a 121°C.

✦ Dicloran Rosa de Bengala Cloramfenicol (**DRBC**)

Peptona	5 g
Glucosa	10 g
KH_2PO_4	1 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5 g
Rosa Bengala	0.025 g
Dicloran	0.002 g
Cloramfenicol	0.1 g
Agar	15 g
Aigua destil·lada	1000 ml

Es barrejaven tots els productes i es portaven a ebullició, excepte el dicloran i el cloramfenicol que es dissolien en alcohol i s'afegien quan el

medi ja bullia, es repartia en ampolles de 500 ml i s'esterilitzava a 121°C durant 20 minuts.

3.2.3.2 Medis de muntatge per a l'observació microscòpica dels aïllaments

✦ Lactofenol (Barnet *et al.* 1974):

Àcid làctic	20 g
Fenol	20 g
Glicerol	40 g
Aigua destil·lada	20 ml

✦ Lactofenol-blau cotó (Barnet *et al.* 1974)

Àcid làctic	20 g
Fenol	20 g
Glicerol	40 g
Blau cotó	0.05 - 0.10 g
Aigua destil·lada	20 ml

✦ Medi PVA (preparacions permanents)

Alcohol polivinil (Sigma)	1.66 g
Àcid làctic	10 ml
Glicerina	1 ml
Aigua destil·lada	10 ml

3.3 Estudi fisiològic

Les proves fisiològiques que hem aplicat a totes les soques incloses a l'estudi s'indiquen a continuació.

3.3.1 Efecte de la temperatura

Aquesta prova s'utilitzava per conèixer les temperatures mínima, òptima i màxima de les soques estudiades i per determinar les taxes de creixement a les diferents temperatures.

L'assaig consistia en sembrar la soca a investigar en plaques de PDA i incubar-les a diferents temperatures (20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 37°C i 40°C). L'inoculació es realitzava fent una sembra en un o dos punts en dos plaques de Petri per cada una de les temperatures a assajar. Les plaques es posaven a incubar comprovant els diàmetres de creixement del fong a les temperatures respectives.

Les diferències entre les diferents taxes de creixement per cada temperatura es van analitzar amb el test de *U Mann-Whitney* fent servir el programa SPSS 11.5 per a Windows.

3.3.2 Assimilació de carbohidrats i nitrats

Es va assajar l'assimilació de 35 fonts de carboni (D-glucosa, D-galactosa, D-glucosamina, D-ribosa, D-xilosa, L-sorbose, L-arabina, D-arabina, L-ramnosa, sucrosa, maltosa, trealosa, celobiosa, salicina, melibiosa, lactosa, rafinosa, glicerol, ribitol, xilitol, L-arabinitol, D-glucitol, D-manitol, inositol, D-fructosa, D-manosa, D-melecitosa, dextrina, midó, citrat, metanol, etanol, àcid malic, àcid làctic i àcid tànic), totes elles amb una concentració final del 2%, i 7 fonts de nitrogen [nitrit de sodi (2.5%), nitrat de potassi (7.8%), creatina (2%), etilamina (6.5%), L-lisina (5.5%), cadaverina (7%) i creatinina (2%)]. Les proves es van fer en microplaques

de 96 pouets. Cada columna contenia 150 µl de medi líquid de nitrogen base (Becton Dickinson Co, Sparks, Maryland) o medi de carboni base (Becton Dickinson Co) en funció del tipus de prova, amb un dels substrats a testar, excepte per aquelles columnes que servien de controls negatius, les quals no tenien cap font de nitrogen o carboni afegida, i aquelles que actuaven de controls positius, les quals contenien glucosa i medi de nitrogen base. Es va afegir 50 µl d'inòcul en cada fila. L'inòcul es preparava afegint solució salina estèril al 0,85% al damunt de la placa i rasant suaument la colònia del fong, per tal d'aconseguir l'alliberament de conidis. Aquesta solució es filtrava i s'ajustava a una absorbància de 0.21 - 0.29 llegint a una longitud d'ona de 520 nm, la qual correspon a un inòcul final a la microplaca de 2×10^5 a 2×10^6 UFC/ml. La viabilitat dels conidis es verificava sembrant 100 µl de les dilucions 10^{-4} i 10^{-5} de cada inòcul en PDA. Les microplaques es llegien entre els 5 i 10 dies d'incubació a 25°C.

3.3.3 Presència de l'enzim ureasa

Per demostrar la presència de l'enzim ureasa es van sembrar tubs de *Christensen's urea agar* (Yarrow 1998), incubant-los a 25°C durant 8 dies. La producció d'ureasa es constata pel canvi de color del medi, passant d'un color beige a un rosa fúcsia.

3.3.4 Formació extracel·lular de polisacàrids

La formació extracel·lular de polisacàrids es va fer sembrant les soques en plaques Petri en un medi d'agar descrit per Yarrow (1998), es van incubar a 30°C durant 2-3 setmanes, passat aquest temps es van remullar les colònies amb una solució diluïda de Lugol, es considerava positiu si es creava un halos de color blau-verd al voltant de la colònia.

3.3.5 Producció d'àcids

La producció d'àcids es va fer en tubs amb el medi *chalk agar* (Yarrow 1998) en pic de flauta, es van incubar a 30°C. Els cultius s'examinaven regularment durant 4 setmanes per tal de detectar l'aclariment del medi al voltant del creixement fúngic, la qual cosa indicava un resultat positiu.

3.3.6 Liquat de la gelatina

La capacitat de liquar la gelatina es va provar en tubs amb un medi sintètic que contenia un 10% de gelatina (Yarrow 1998) i es van incubar a 25°C durant 60 dies. Al final d'aquest període els tubs es van refrigerar a 4°C durant 1 h per veure la hidròlisis del medi.

3.3.7 Resistència a diferents concentracions de cicloheximida, NaCl i MgCl₂

Aquestes proves es van realitzar amb el mètode de les microplaques, igual com per l'assimilació de carbohidrats, però en medi nitrogen base amb un 5% de glucosa (de Hoog *et al.* 1994). La cycloheximida es va testar a unes concentracions finals de 0.1%, 0.25% i 1%, i el NaCl i el MgCl₂ amb unes concentracions finals de 2%, 5% i 10% per cada un d'ells. Els resultats igual que per l'assimilació de carbohidrats es van llegir als 5-10 dies i es van incubar a 25°C.

3.4 Tècniques de biologia molecular

Els estudis moleculars van incloure l'extracció d'àcids nuclèics, la reacció en cadena de la polimerasa per cadascun dels fragments i la seqüenciació dels mateixos per cada una de les soques estudiades.

3.4.1 Extracció d'ADN

Les soques es sembraven en plaques de PDA i s'incubaven durant 2-3 setmanes a 30°C. L'extracció de l'ADN fúngic es va realitzar amb el kit comercial Fast DNA (Bio 101, Inc., Vista, Calif.). Seguint el següent protocol: la mostra fúngica s'obtenia mitjançant el raspat d'aproximadament uns 200 mg de la colònia i s'introduïen en un tub de microcentrífuga de 2 ml. Aquests tubs contenien una esfera de ceràmica, i una petita quantitat de partícules arenoses que facilitaven el trencament cel·lular, a més se li afegia una solució que funcionava com a tampó de lisi i components estabilitzadors de l'ADN (CLS-Y). Els tubs es col·locaven a un aparell de centrifugació i oscil·lació [FastPrep FP120 (Thermo Savant, Holbrook, N. Y.)] per provocar la ruptura de les cèl·lules fúngiques durant 30 segons, aquest pas es repetia tres vegades deixant la mostra en gel durant 10 minuts després de cada homogeneïtzació. A continuació es realitzava una centrifugació a 14000 rpm durant 10 min per separar les restes cel·lulars i les proteïnes. Es transferien 600 µl del sobrenadant a un altre tub de microcentrífuga i se li afegien 600 µl de la solució "Binding Matrix" que funcionava com a matriu de fixació per a l'ADN i s'incubava durant 5 min a temperatura ambient. A continuació es centrifugava durant 1 min a 14000 rpm i el precipitat resultant (matriu + ADN) es ressuspensia en 500 µl d'una solució de rentat (SEWS-M). A continuació es realitzava una centrifugació d'1 min a 14000 rpm. Per recuperar l'ADN fixat a la matriu, s'afegien 100 µl d'una solució d'aclarit (DES) que es deixava actuar durant 3 min, passat aquest temps es procedia a una nova centrifugació d'1 min a 14000 rpm. El sobrenadant era transferit

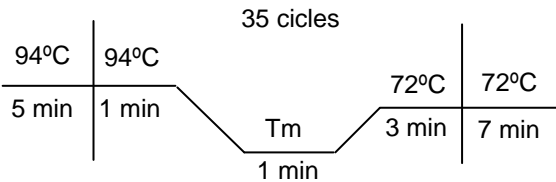
a un tub de microcentrífuga d'1.5 µl i a continuació, per eliminar les restes de partícules de la matriu, era novament centrifugat.

3.4.2 Amplificació dels gens

Es van amplificar fragments dels gens de la calmodulina (CAL), la quitina sintasa (CHS), la β -tubulina (BT2), el gen 5.8S de l'ADNr i les regions ITS i els dominis D1-D2 del gen 28S de l'ADNr, utilitzant els cebadors que es mostren a la Taula 4.

Les reaccions per als gens estructurals de la quitina sintasa, la calmodulina i la β -tubulina es van realitzar amb *Ready-To-Go PCR beads* (Amersham Bioscience) als quals se'ls hi va afegir uns 90 ng d'ADN i el parell de cebadors corresponents, amb un volum final de reacció de 25 µl. Per als gens de l'ADNr es van fer amb una mescla composta per uns 90 ng d'ADN, 10 mM Tris HCl (pH 8.3), 50 mM KCl i 2.5 mM MgCl₂ en un volum final de 25 µl (Roche molecular Systems, Branchburg, NJ, EUA), 100 µl de cada dNTP (Promega, Madison, Wis, USA) 1 µl de cada cebador i 1.5 U de AmpliTaq ADN polimerasa (Roche). La reacció de PCR es va realitzar amb un termociclador GeneAmp PE 2004 seguint el protocol descrit per Herion *et al.* (1994) amb algunes modificacions (Gené *et al.* 1996). La reacció de PCR constava dels següents passos:

1. Desnaturalització inicial de 5 min a 94°C
2. 35 cicles cada un dels quals constava de tres fases:
 - Desnaturalització, 1min a 94°C,
 - Anellament, 1 min a la temperatura de fusió (T_m), calculada per a cada cebador (Taula 4)
 - Elongació, 3 min a 72°C
3. Extensió final, 7 min a 72°C.



Per tal de visualitzar i analitzar els resultats de les amplificacions, 2 µl de cada reacció es sotmetien a una electroforesi en gel d’agarosa al 2%. Per tal de comprovar la longitud del fragment amplificat s’afegien al primer i últim pouet, el marcador de pes molecular 100 bp Ladder (Invitrogen, Barcelona, Espanya).

El producte de la PCR es va purificar mitjançant el kit GFX TM PCR DNA (Amersham biosciences) i va congelar a -20°C fins el moment de la seva utilització.

Taula 4. Cebadors utilitzats per a l’amplificació i la seqüenciació dels diferents gens. Temperatures d’anellament i longitud del fragment amplificat.

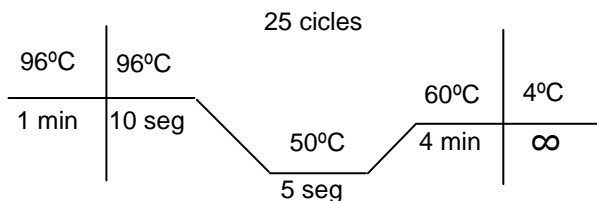
Regió	Cebador	Seqüències (5' a 3')	Tm (°C)	Longitud del producte	Referències
ITS del ADNr	ITS 4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	50	500	White <i>et al.</i> 1990
	ITS 5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG			
28S	NL1	GCATATCAATAAGCGGAGGAAAA	50	550	O'Donnell 1993
	NL4	GGTCCGTGTTTCAAGACGG			
CAL	CL1	GA(AG)T(AT)CAAGGAGGCCTTCTC	60	800	O'Donnell 2000
	CL2A	TTTTTGCATCATGAGTTGGAC			
Bt2	Bt2A	GG(CT)AACCA(AG)AT(ATC)GGTG (CT)GC(CT)TTC	60	500	Glass i Donalson. 1995
	Bt2B	ACCCTC(AG)GTGTAGTGACCCTTGGC			
CHS	CHS-79F	TGGGGCAAGGATGCTTGAAGAAG	55	300	Carbone i Kohn 1999
	CHS-354R	TGGAAGAACCATCTGTGAGAGTTG			

Abreviacions: ITS: Espaiador intern; CAL: Calmodulina; Bt2: beta-tubulina; CHS: quitina sintasa.

3.4.3 Seqüenciació dels productes de la PCR

El protocol utilitzat per a la seqüenciació va ser el recomanat al kit "Taq DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing" (Applied Biosystems). Les reaccions es van realitzar utilitzant els mateixos cebadors que per realitzar la PCR diluïts a 3.3. La mescla de la reacció contenia 4 µl de Big dye, 2 µl de 5x sequencing buffer, 1 µl de primer, 9 µl d'aigua miliQ i 4 µl d'ADN. La reacció es va realitzar al termociclador GeneAmp PE 2004, amb les següents condicions:

1. Desnaturalització inicial d'1 min a 96°C
2. 25 cicles cada un dels quals constava de tres fases:
 - Desnaturalització, 10 seg a 96°C,
 - Anellament, 5 seg a 50°C
 - Elongació, 4 min a 60°C
3. Conservació de la mostra a 4°C



3.4.4 Precipitació i preparació per la seqüenciació

Per tal de preparar les mostres per analitzar al seqüenciador es realitzava una precipitació del producte de seqüenciació, sota el següent procediment:

- Barreja del producte de seqüenciació amb 60 µl d'etanol al 100% i 5 µl de EDTA 125 mM.
- Vortejar i incubar 15 min a temperatura ambient.

- Centrifugació a 14000 rpm durant 20 minuts.
- Llençar el sobrenadant per decantació.
- Afegir 60 µl d'etanol al 70%
- Centrifugar a 14000 rpm durant 5 min.
- Llençar el sobrenadant per decantació.
- Secar al *Speed-Vac* durant 15 min.

Un cop finalitzada la precipitació les mostres es guardaven a -20°C fins al seu processament.

El protocol de preparació per la seqüenciació era el següent:

- Afegir 28 µl de TSR (Template Supresion Reagent) a cada mostra.
- Deixar 10 min a temperatura ambient per la rehidratació.
- Centrifugar a 14000 rpm durant 2 min.
- Desnaturalitzar les mostres durant 3 min. a 95°C.
- Posar les mostres en gel seguidament i mantenir-les fins al moment de posar-les al seqüenciador.

Els productes resultants es van analitzar al seqüenciador capil·lar *ABIPrism 310 DNA sequencer* (Applied Biosistems). Les seqüències consens es van obtenir utilitzant el programa Autoassembler (Applied Biosistems).

3.4.5 Alineament de les seqüències i anàlisis filogenètiques

Les seqüències s'alineaven amb el programa Clustal X (Thompson *et al.* 1997). Els alineaments es corregien visualment mitjançant un processador de text (Microsoft Word 2000).

Les relacions evolutives es van reconstruir utilitzant dos mètodes :

- Mètode de distàncies genètiques o Neighbour-joining amb el programa MEGA 2.1 (Kumar *et al.* 2001), utilitzant el model de 2 paràmetres de Kimura (Kimura 1980), incloent les transicions i transversions. Els valors de confiança per cada agrupament es van determinar amb l'anàlisi de *bootstrap* (1000 repliques) (Feldenstein 1985).
- Mètode de màxima parsimònia (basat en caràcters conservats) amb el programa PAUP* (*Phylogenetic Analysis Using Parsimony, *and other methods*) versió 4.0b10 (Swofford 2001). Es va realitzar una cerca heurística de 100 repeticions amb l'addició aleatòria de taxons (*random sequence addition*) i amb intercanvi de branques (*branch-swapping algorithms*) del tipus TBR (*tree bisection-reconnection*), es va deixar l'opció Multrees per defecte (PAUP* guarda tots els arbres mínims que troba durant l'intercanvi de rames) i es van colapsar les rames amb longitud màxima igual a zero. Els gaps es van considerar com a no informatius. La fiabilitat de les rames es va valorar amb una anàlisi de *bootstrap* de 5000 rèpliques. Per tal de detectar incongruències en l'anàlisi combinada dels gens es va fer el test de partició homogènia (PHT) que es troba dins el programa PAUP*, si el valor del PHT generat per la unió dels nostres gens tenia una $P < 0.001$ els gens no es podien unir per fer l'anàlisi combinat (Cunningham 1997). També es va realitzar el *Kishino-Hasegawa maximum-likelihood test* (Kishino i Hasegawa 1989) també dins el programa PAUP* per tal de testar relacions filogenètiques alternatives.

Després d'un estudi previ amb els gens indicats anteriorment vam determinar com a gens més informatius i per tant com a gens d'elecció per estudiar la filogènia d'*S. schenckii* els gens de la quitina sintasa, la calmodulina i la β -tubulina (BT2).

3.4.6 Dipòsit de seqüències

Totes les seqüències obtingudes durant el desenvolupament de la present tesi doctoral, s'han dipositat a la base de dades del *European Molecular Biology Laboratory* (EMBL). A l'annex 1 es detallen els seus números d'accés.

3.5 Estudis de sensibilitat *in vitro* als antifúngics. Tècnica de microdilució

Per tal d'estudiar la sensibilitat *in vitro* que podien presentar les nostres soques en front als antifúngics, vam testar per la tècnica de microdilució un total de dotze antifúngics diferents.

3.5.1 Antifúngics utilitzats

Per la realització dels estudis de sensibilitat *in vitro* als antifúngics es van utilitzar els productes subministrats directament pels laboratoris fabricants. Tots ells van ser substàncies pures, i no es van utilitzar en cap cas preparats comercials.

La relació i l'origen d'aquests es detalla a continuació:

Albaconazol (UR-9825) (ABC). Subministrat pels laboratoris Uriach i Cia de Barcelona.

Amfotericina B (AMB). Es va obtenir de la farmacèutica Squibb Industrial S.A., Barcelona, Espanya.

Eberconazol (EBC). Subministrat pels Laboratoris Salvat, Barcelona.

Fluconazol (FLC). Subministrat per Pfizer Inc., Madrid, Espanya.

5-fluorocitosina (5-FC). Subministrat per Sigma-Aldrich corp., St. Louis, EUA.

Itraconazol (ITC). Subministrat pels laboratoris Janssen Pharmaceutical de Beerse, Bèlgica.

Ketoconazol (KTC). Subministrat per USP, Rockville, EUA.

Micafungina (MFG). Subministrat per Fujisawa Pharmaceutical Co. Ltd., Osaka, Japó.

Posaconazol (PSC). Subministrat per Schering-Plough Research Institute, New Jersey, EUA.

Ravuconazol (BMS-207147) (RVC). Subministrat per Bristol-Myers Squibb Company, de New Brunswick, New Jersey, EUA.

Terbinafina (TBF). Subministrat pels laboratoris Novartis de Basilea, Suïssa.

Voriconazol (UK-109496) (VRC). Subministrat pels laboratoris Pfizer de Madrid.

Tots es van emmagatzemar a temperatura ambient, excepte la TBF i l'AMB, que es va guardar a 4 °C, i la MFG que es guadaava a -20°C.

3.5.2 Preparació de les microplaques d'antifúngics

El mètode que es va seguir per la preparació de les microplaques està descrit de forma detallada al document M38 A del CLSI (NCCLS 2002). De forma resumida, primer s'establia per cada antifúngic el rang de dilucions que es volien testar. Si l'antifúngic estava inclòs al document M38A (AMB, ITC, KTC, VRC, FLC, 5-FC) s'utilitzava el rang indicat, i si l'antifúngic no estava inclòs al document M38 (MFG, RVC, ABC, TBF, EBC, PSC) es consultava la bibliografia existent. A continuació es preparava un banc de dilucions dobles seriades utilitzant com a dissolvent DMSO (dimetil sulfòxid), per tots els antifúngics excepte per la MFG, la 5-FC i FLC pels quals es va utilitzar aigua destil·lada, seguint l'esquema que es mostra a la Fig. 11. A partir de la dilució més concentrada (solució 1600 µg/ml a l'exemple representat a la figura), cada concentració representa la meitat de l'anterior.

Les dilucions es preparaven seguint un esquema que minimitza els errors al pipetejar. A partir del primer tub que per exemple estava a una concentració de 1600 µg/ml es preparaven els tres tubs següents (800, 400, 200). A partir del tub amb una concentració de 200 es preparaven els tubs amb 100, 50, i 25, i a partir d'aquest últim es preparava la resta.

Posteriorment es diluïa el contingut de cada un dels 10 tubs en medi RPMI en proporció 1:50 i es dispensava en microplaques (100 µl/pouet). Cada dilució es dispensava en una columna començant per la columna 1 en ordre de major a menor concentració. Les dues últimes columnes s'omplien amb medi RPMI + 2% DMSO i s'utilitzaven per fer el control negatiu (control del medi) i el positiu (control de creixement del fong).

Les plaques un cop preparades es segellaven per evitar l'evaporació del líquid i es congelaven a -20°C. El dia de l'assaig, les microplaques es descongelaven a temperatura ambient i s'inoculaven amb 100 µl de la suspensió de l'inòcul i s'incubaven a 30°C.

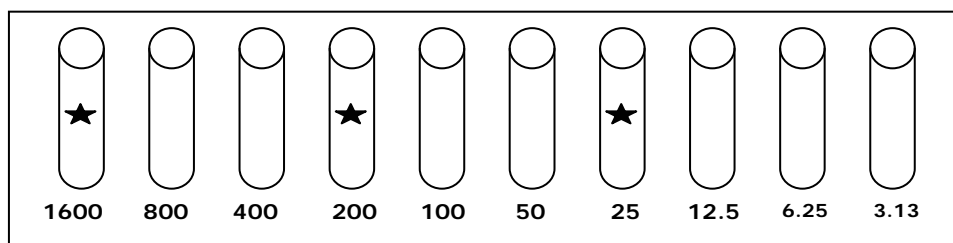


Fig. 11. Esquema de les dilucions d'un antifúngic. Els tubs assenyalats amb una estrella són els que serveixen per preparar les tres dilucions següents.

3.5.3 Preparació dels inòculs

Els inòculs de totes les soques estudiades provenien de cultius en plaques de PDA, les quals es van incubar entre 5 i 6 dies a una temperatura entre 25 - 30°C. Les colònies es van cobrir amb solució salina estèril al 0,85% i es rascaven suaument amb l'extrem d'una pipeta Pasteur. Aquesta

suspensió es va transferir a un tub Falcon fent-la passar a través d'una gassa estèril. Els inòculs es van ajustar a 520 nm a una absorvència de 0.09-0.11, la qual correspon a un inòcul final de 4×10^5 – 5×10^6 conidis/ml de i es van diluir 1:50 en RPMI. La concentració i la viabilitat de l'inòcul es verificava sembrant 100 µl de les dil·lucions 1:1000 i 1:10000 en plaques de PDA.

Seguint les recomanacions del document M38A, a cada assaig es va incloure la soca control de *Candida krusei* ATCC 6558 i *C. parapsilosis* ATCC 22019

3.5.4 Lectura e interpretació dels resultats

La lectura dels resultats es va realitzar de manera visual amb l'ajut d'un mirall invertit. Cada pouet era comparat amb aquell que tenia el control de creixement sense antifúngic i els resultats es valoraven mitjançant una escala numèrica del 0 al 4:

- 0 = pouets òpticament clars, sense creixement fúngic (100% d'inhibició del creixement)
- 1 = creixement escàs (75% d'inhibició del creixement)
- 2 = creixement moderat (50% d'inhibició del creixement)
- 3 = creixement abundant (25% d'inhibició del creixement)
- 4 = creixement igual que el pouet control de creixement (0% d'inhibició del creixement)

3.6 Estudi de patogenicitat

Per a realitzar els estudis de patogenicitat, es van utilitzar 2 soques pertanyent a cada una de les espècies d'*Sporothrix* proposades a partir dels resultats dels estudis de filogènia i fenotípic. Les soques estudiades van ser CBS 120339, UTHSC 99-173, UTHSC 01-2137, CBS 120339, IPEC 16919, CBS 120340, MCCL 220082, CBS 120341, CBS 120342, CBS 302.73 i KMU4217.

Es van utilitzar ratolins mascles "outbred" OF-1 (Charles River, Wilmington, EUA) de 31 g de pes.

Per a preparar els inòculs es van fer créixer les soques en medi PDA durant aproximadament 8 dies. Les plaques es van cobrir amb 3-5 ml de solució fisiològica i la superfície de les colònies es va arrossegat suaument amb una pipeta estèril per tal d'obtenir una suspensió barreja de conidis, hifes i restes d'agar. Aquesta suspensió es va filtrar a través de 2 gasses estèrils per tal d'obtenir una suspensió exclusivament constituïda per conidis. Després es va ajustar a la concentració de 1×10^8 i 1×10^5 conidis/ml mitjançant el recompte en càmera de Neubauer.

Per cada soca vam infectar 5 animals amb la concentració 1×10^8 conidis/ml i 5 animals més per la de 1×10^5 conidis/ml. Els inòculs es van administrar per via intravenosa través de la vena lateral de la cua. Vam observar els ratolins durant 40 dies, i finalment van ser sacrificats segons els protocols aprovats pel comitè ètic de la Universitat Rovira i Virgili, que va ser per asfíxia per inhalació de CO_2 .

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

FILOGÈNIA MOLECULAR I CARACTERITZACIÓ FENOTÍPICA DEL COMPLEX D'ESPÈCIES DE
SPOROTHRIX SCHENCKII

Rita Marimón Picó

ISBN: 978-84-691-1554-1 /DL:T.147-2008

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
FILOGÈNIA MOLECULAR I CARACTERITZACIÓ FENOTÍPICA DEL COMPLEX D'ESPÈCIES DE
SPOROTHRIX SCHENCKII
Rita Marimón Picó
ISBN: 978-84-691-1554-1 /DL:T.147-2008

4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

FILOGÈNIA MOLECULAR I CARACTERITZACIÓ FENOTÍPICA DEL COMPLEX D'ESPÈCIES DE
SPOROTHRIX SCHENCKII

Rita Marimón Picó

ISBN: 978-84-691-1554-1 /DL:T.147-2008

4.1 Filogènia molecular d'*Sporothrix schenckii*

Aquest estudi va ser publicat al *Journal of Clinical Microbiology* 44:3251-3256, 2006 (veure Annex 2) amb el format de treball original que es mostra a continuació.

Resum

El fong patògen *Sporothrix schenckii* és l'agent responsable de l'esporetricosi, una important infecció fúngica de distribució mundial. El coneixement sobre l'estructura poblacional d'*S. schenckii* és escàs, malgrat que estudis moleculars i fenotípics sembla ser que demostren l'existència de diferents llinatges dins d'aquesta espècie. L'objecte d'aquest estudi va ser determinar, a partir de l'anàlisi de seqüències de tres loci codificants de proteïnes (quitina sintasa, β -tubulina i calmodulina), si aquesta variabilitat era deguda a una divergència d'espècies o una variabilitat intraespecífica dins de *S. schenckii*. En l'anàlisi es van incloure 60 aïllats (59 d'origen clínic i un d'origen ambiental) d'aquesta espècie d'un ampli rang geogràfic. Per l'anàlisi filogenètic es van utilitzar les seqüències d'ADN de tres regions nuclears. L'anàlisi combinat dels tres loci revelà la presència de tres grans *clades*, un agrupava totes les soques d'origen europeu, l'altre només aïllats procedents del Brasil i el tercer aïllats d'altres països de Sud Amèrica i d'Àfrica. Es van obtenir 14 nodes suportats amb un índex de *bootstrap* del 100%, 6 d'ells representants de espècies filogenètiques putatives. Els nostres resultats demostraren que la majoria d'aquestes espècies prevalien en diferents regions geogràfiques.

Introducció

Sporothrix schenckii és un fong dimòrfic, responsable de l'esporetriosi, una infecció crònica granulomatosa que afecta a la pell i als teixits subcutanis, encara que pot disseminar, afectant a qualsevol òrgan del cos humà (3). La infecció es troba distribuïda mundialment, encara que és més comú de regions tropicals i subtropicals. *Sporothrix schenckii* té el seu hàbitat natural al terra i a les plantes, encara que s'ha aïllat d'una gran varietat de substrats (5, 14, 26). Recentment estudis moleculars han demostrat l'existència d'un alt grau de variabilitat intraespecífica i que els aïllats s'agrupen principalment segons el seu origen geogràfic (10, 11, 14, 16).

Més recentment, en base a l'anàlisi de les seqüències de la regió ITS, s'ha suggerit que podria existir més d'una espècie dins d'*S. schenckii* (27). Travassos i Lloyd (26) i Ghosh *et al.* (6) també han trobat diferències morfològiques i fisiològiques entre els aïllats d'origen clínic i aquells d'altres fonts. També s'han trobat diferències entre la virulència de soques clíniques i ambientals, però no s'ha trobat cap correlació amb les diferents formes clíniques d'esporetriosi (5, 16, 26).

L'objectiu d'aquest estudi va ser utilitzar seqüències d'ADN de múltiples loci per tal de valorar el grau de clonalitat dins un grup de soques clíniques d'*S. schenckii* de diferents regions geogràfiques. Diversos estudis basats en seqüenciació de múltiples gens havien demostrat l'existència de nombroses espècies filogenètiques dins d'espècies ben establertes morfològicament (4, 7, 17). No obstant, la definició d'espècie filogenètica es polèmica (13). Taylor *et al.* (24) argumenten que en que en el reconeixement d'espècies filogenètiques la genealogia d'un sol gen no és suficient, i que la concordança genealogica de múltiples gens és necessària. Aquest ha sigut el criteri utilitzat aquí per tal de definir espècies filogenètiques. Hem tingut la oportunitat d'assajar un gran nombre d'aïllats d'una regió de Rio de Janeiro, en la que la seva població es veia afectada per un brot d'esporetriosi de

transmissió felina (22) i malgrat que aquest estudi no es va dissenyar amb el propòsit de tipar, un altre objectiu va ser el de determinar si aquestes infeccions eren causades per una sola soca molt virulenta o tenia orígens múltiples.

Materials i mètodes

Aïllats fúngics. Per tal de realitzar aquest estudi es van incloure un total de seixanta aïllats morfològicament identificats com a *S. schenckii* (59 d'origen clínic i 1 d'origen ambiental) (Taula 1). Els aïllats clínics provenien de diferents col·leccions de cultius (Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Holanda; Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Reus, Espanya; BCCM/IHEM Biomedical Fungi and Yeasts Collection, Brussel·les, Bèlgica; Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fiocruz, Brasil; Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de Sao Paulo, Sao Paulo, Brasil; i Biological Resource Center, Chiba, Japó). La majoria dels aïllats del Brasil (18) i l'aïllat ambiental estaven relacionats amb un brot d'espótricosi de transmissió felina del Brasil (22). Aquests aïllats clínics procedien d'onze pacients, i l'aïllat ambiental de la pols de la casa d'un dels pacients. Els aïllats es guardaven en PDA (Difco Laboratories, Detroit, Mich.) a 4-7°C i en cultius submergits en oli a temperatura ambient.

Extracció, amplificació i seqüenciació de l'ADN. L'ADN es va extreure i purificar directament de colònies fúngiques seguint el protocol del *Fast DNA kit* (Bio 101, Inc., Vista, Calif.) amb el pas de l'homogeneïtzació repetit tres cops amb l'aparell FastPrep FP120 (Thermo Savant, Holbrook, N.Y.). Després de cada homogeneïtzació la mostra es mantenia en gel durant 10 min. L'ADN es quantificava amb el GeneQuant *pro* (Amersham Pharmacia Biotech, Cambridge, England). Es van amplificar per PCR les següents regions de gens nuclears: la quitina sintasa (CHS) amb els cebadors CHS-79F i CHS-354R (2), el gen de la calmodulina (CAL) amb els cebadors degenerats CL1 i CL2A (17) i la β -tubulina (Bt2) amb cebadors

degenerats per nosaltres: Bt2-F [5'GG[CT]AACCA(AG)AT(ATC)GGTGC(CT)GC(CT) 3'] i Bt2-R [5' ACCCTC (AG) GTGTAGTGACCCTTGGC 3'] a partir dels cebadors Bt2a i Bt2b descrits per Glass i Donaldson (8). Les amplificacions es van fer seguint el protocol del kit *Ready-To-Go PCR bead* (Amersham Bioscience, Freiburg, Alemanya). Per cada reacció es van afegir de 20 a 60 ng d'ADN i de 0.5 a 1 mM de concentració per a cada cebador en un volum total de 25 µl. El programa d'amplificació incloïa una desnaturalització inicial de 95°C durant 30 s, seguit de 35 cicles consistents en una desnaturalització a 95°C durant 30 s, l'anellament durant 1 min a 55°C (CHS) o 60°C (CAL i Bt2), i una extensió d'1 min a 72°C, i un pas final de 72°C durant 7 min. Els productes de la PCR es van purificar amb el kit *GFX™ PCR DNA purification* (Pharmacia Biotech, Cerdanyola, Espanya) i es van guardar a -20°C fins al moment de la seqüenciació. Els productes de la PCR es van seqüenciar utilitzant els cebadors anteriorment mencionats i seguint el protocol *Taq DyeDeoxy Terminator cycle sequencing kit* (Applied Biosystems, Gouda, Holanda). Els productes de la reacció de seqüenciació es van analitzar al seqüenciador *310 DNA sequencer* (Applied Biosystems).

Anàlisi filogenètic. Les seqüències es van alinear amb el programa Clustal X (versió 1.81) (25), seguit d'un ajust manual en un processador de text. El nombre de posicions sinònimes i no sinònimes es va calcular pel mètode de Nei i Gojobori (15) implementat al programa DnaSP (19). Els arbres més parsimoniosos es van obtindre amb el programa PAUP* (versió 4.0b10) (23). Es va realitzar una cerca heurística de 100 repeticions amb l'addició aleatòria de taxons (*random sequence addition*) i amb intercanvi de branques (*branch-swapping algorithms*) del tipus TBR (*tree bisection-reconnection*), es va deixar l'opció Multrees per defecte (PAUP* guarda tots els arbres mínims que troba durant l'intercanvi de branques) i es van colapsar les rames amb longitud màxima igual a zero. Els gaps es van considerar no informatius. La fiabilitat dels agrupaments es va valorar amb un anàlisi de *bootstrap* de 5000 rèpliques. L'anàlisi combinat es va testar per detectar incongruències amb el test de partició homogenia implementat

al programa PAUP*. Per tal de testar relacions filogenètiques alternatives es va realitzar el test de Kishino-Hasegawa (12) també inclòs en el programa PAUP*.

Nombres d'accés de les seqüències de nucleòtids. Totes les seqüències obtingudes en aquest estudi es van dipositar a la base de dades del EMBL i se'ls hi va assignar un número d'accés detallat a la Taula 1.

Resultats

Amb els cebadors utilitzats, vam ser capaços d'amplificar i seqüenciar 280 pb, 410 pb i 776 pb dels gens CHS, Bt2 i CAL, respectivament, de 60 soques d'*S. schenckii* (Taula 2). Dels 1466 nucleòdis seqüenciats 1311 eren constants, 132 (9.00%) eren parsimònics informatius i 23 parsimònic no informatius. El menor nombre va ser d'11 per al fragment CHS i el més elevat 87 pel fragment de la CAL. El nombre total de posicions sinònimes i no sinònimes va ser de 0 i 23 respectivament (13 per CHS, 5 per Bt2 i 5 per CAL) (Taula 2).

Les seqüències dels tres gens es van analitzar filogenèticament per separat i en un anàlisi combinat. En tots els arbres obtinguts en l'anàlisi filogenètica de cada locus, es van observar tres gran *clades*. Un comprenia totes les soques de Brasil (*clade* I) incloent la única soca ambiental testada. Un altre *clade* (*clade* II) agrupava la resta de soques de Sud Amèrica i tres soques més, incloent la soca tipus. El tercer *clade* (*clade* III) agrupava els aïllats europeus, tots d'origen espanyol, excepte un aïllat d'origen desconegut.

Taula 1. Aïllats inclosos a l'estudi i el seu origen

Aïllat	Origen	Nº d'accés al EMBL		
		CHS	BT2	CAL
IPEC 16042	Lesió cutània, Rio de Janeiro, Brasil	AM117416	AM116932	AM116885
IPEC 16243	Lesió cutània, Rio de Janeiro, Brasil	AM117419	AM116957	AM116877
IPEC 16490	Lesió cutània, Rio de Janeiro, Brasil	AM117417	AM116946	AM116899
IPEC 16503	Lesió cutània, Rio de Janeiro, Brasil	AM114894	AM116941	AM116875
IPEC 16550	Lesió cutània, Rio de Janeiro, Brasil	AM114893	AM116953	AM116892
IPEC 16864	Lesió cutània, Rio de Janeiro, Brasil	AM117414	AM116951	AM116889
IPEC 16919	Lesió cutània, Rio de Janeiro, Brasil	AM117407	AM116934	AM116898
IPEC 15572	Lesió cutània, Rio de Janeiro, Brasil	AM117411	AM116955	AM116886
IPEC 16456	Lesió cutània, Rio de Janeiro, Brasil	AM117406	AM116931	AM116897
IPEC 17943	Líquid cefaloraquídi, Rio de Janeiro, Brasil	AM117410	AM116935	AM116878
IPEC 17307	Lesió cutània, Rio de Janeiro, Brasil	AM117415	AM116949	AM116896
IPEC 17331	Lesió cutània, Rio de Janeiro, Brasil	AM114899	AM116939	AM116880
IPEC 17608	Lesió cutània, Rio de Janeiro, Brasil	AM117408	AM116937	AM116890
IPEC 17692	Lesió cutània, Rio de Janeiro, Brasil	AM114897	AM116933	AM159127
IPEC 17920	Lesió cutània, Rio de Janeiro, Brasil	AM114891	AM116938	AM116888
IPEC 17786	Lesió cutània, Rio de Janeiro, Brasil	AM114898	AM116954	AM116884
IPEC 17521	Lesió cutània, Rio de Janeiro, Brasil	AM114895	AM116952	AM116874
IPEC 17585	Lesió cutània, Rio de Janeiro, Brasil	AM114892	AM116940	AM116887
IPEC 22487	Sang, Rio de Janeiro, Brasil	AM117409	AM116944	AM116882
IPEC 22493.1	Lesió cutània, Rio de Janeiro, Brasil	AM117412	AM116945	AM116894
IPEC 22493.2	Lesió cutània, Rio de Janeiro, Brasil	AM114900	AM116936	AM116883
IPEC 22496.4	Lesió cutània, Rio de Janeiro, Brasil	AM117413	AM116950	AM116895
IPEC 22496.5	Lesió cutània, Rio de Janeiro, Brasil	AM114896	AM116947	AM116879
IPEC 22582	Biòpsia òssia, Rio de Janeiro, Brasil	AM114889	AM116956	AM116891
IPEC 22593	Esput, Rio de Janeiro, Brasil	AM114890	AM116942	AM116893
IPEC 22542/2	Esporotricosi disseminada, Rio de Janeiro, Brasil	AM117418	AM116948	AM116881
IHEM 3774	Esporotricosi humana, Colòmbia	AM114873	AM116921	AM117447
IHEM 3787	Desconegut, Sud Àfrica	AM114870	AM116925	AM117435
IHEM 15477	Nòdul cutani, Bolívia	AM114878	AM116916	AM117444
IHEM 15486	Esporotricosi humana, Perú	AM114882	AM116929	AM117432
IHEM 15489	Esporotricosi humana, Perú	AM114883	AM116926	AM117430

Taula 1. Aïllats inclosos a l'estudi i el seu origen (cont.)

Aïllats	Origen	Nº d'accés al EMBL		
		CHS	BT2	CAL
IHEM 15499	Esporotricosi humana, Perú	AM114885	AM116928	AM117434
IHEM 15502	Esporotricosi humana, Perú	AM114884	AM116927	AM117427
IHEM 15503	Esporotricosi humana, Perú	AM114881	AM116930	AM117433
IHEM 15508	Esporotricosi humana, Perú	AM114875	AM116924	AM117443
IHEM 15511	Esporotricosi humana, Perú	AM114874	AM116917	AM117440
CBS 359.36 (T)	Desconegut	AM114872	AM116911	AM117437
NBRC 5984	Desconegut	AM117424	AM116967	AM116900
NBRC 6072	Desconegut	AM117420	AM116960	AM116904
NBRC 8158	Desconegut	AM114868	AM116910	AM117438
FMR 8337	Pols de casa, Rio de Janeiro, Brasil	AM117421	AM116943	AM116876
FMR 8594	Lesió a la mà, Espanya	AM114864	AM116965	AM116906
FMR 8595	Lesió al canell, Espanya	AM117425	AM116959	AM116905
FMR 8596	Lesió al braç, Espanya	AM114866	AM116963	AM116902
FMR 8597	Lesió a la cama, Espanya	AM117426	AM116964	AM116907
FMR 8598	Lesió al braç, Espanya	AM114867	AM116962	AM116903
FMR 8600	Lesió a la cara, Espanya	AM117422	AM116966	AM116908
FMR 8601	Lesió al dit de la mà, Espanya	AM114865	AM116958	AM116901
FMR 8602	Lesió a la mà, Espanya	AM117423	AM116961	AM116909
FMR 8604	Lesió cutània limfàtica, Perú	AM114886	AM116914	AM117429
FMR 8605	Lesió cutània limfàtica, Perú	AM114869	AM116923	AM117442
FMR 8606	Lesió cutània limfàtica, Perú	AM114888	AM116913	AM117431
FMR 8607	Lesió cutània limfàtica, Perú	AM114887	AM116912	AM117428
FMR 8608	Lesió cutània limfàtica, Perú	AM114879	AM116919	AM117441
FMR 8609	Lesió cutània limfàtica, Perú	AM114880	AM116918	AM117439
FMR 8677	Esporotricosi disseminada, Argentina	AM114871	AM116914	AM117436
FMR 8678	Biòpsia cutània, Argentina	AM114876	AM116920	AM117446
FMR 8679	Nòdul cutani limfàtic, Argentina	AM114877	AM116922	AM117445
FMR 9034	Esporotricosi humana, Sao Paulo, Brasil	AM261684	AM261686	AM261688
FMR 9035	Esporotricosi humana, Sao Paulo, Brasil	AM261685	AM261687	AM261689

Taula 2. Variabilitat dels loci utilitzats ens els 60 aïllats assajats

Locus	Nº. de pb seqüenciats	Nº genotips	Nº de llocs variables (%)	Nº de posicions parsimonic informatives	Nº substitucions sinònimes	Genotips per base variable
CHS	280	8	13 (4.6)	11	13	0.61
Bt2	410	13	42 (10.24)	37	5	0.30
CAL	776	21	100 (12.8)	84	5	0.21

Les seqüències dels tres gens es van analitzar filogenèticament per separat i en un anàlisi combinat. En tots els arbres obtinguts en l'anàlisi filogenètica de cada locus, es van observar tres gran *clades*. Un comprenia totes les soques de Brasil (*clade* I) incloent la única soca ambiental testada. Un altre *clade* (*clade* II) agrupava la resta de soques de Sud Amèrica i tres soques més, incloent la soca tipus. El tercer *clade* (*clade* III) agrupava els aïllats europeus, tots d'origen espanyol, excepte un aïllat d'origen Desconegut.

El resultat del test de partició homogènia (PHT) va mostrar que l'anàlisi combinada dels tres loci era congruent ($p=0.11$) i que per tant és podien combinar. Un total de 5000 arbres de MP es van produir en la cerca heurística, utilitzant l'anàlisi combinat dels 1466 caràcters dels tres loci. Els arbres tenien un índex de consistència (CI) de 0.925, un índex de retenció (RI) de 0.991 i un índex d'homoplàsia (HI) de 0.074. Es van poder distingir un total de 29 genotips diferents (Fig. 1). Es van obtenir un total de catorze nodes suportats amb un índex de *bootstrap* del 100% representant sis espècies filogenètiques putatives. La distribució va ser similar a l'obtinguda en els arbres individuals dels diferents gens estudiats, especialment amb el locus de la CAL. L'arbre va mostrar els mateixos tres grans *clades* observats per els altres loci, cada un d'ells amb un índex de *bootstrap* del 100%.

Els 18 aïllats del brot d'espótricosi del Brasil es van localitzar amb la resta d'aïllats d'aquest país, al *clade* I. Aquests s'havien aïllat d'onze

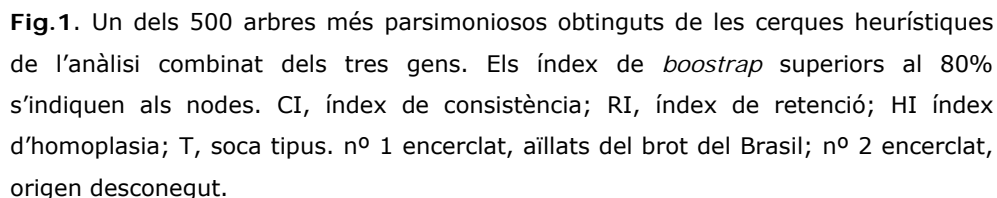
pacients (Taula 3). Quatre pacients tenien més d'un aïllat, els quals en dos casos (P3 i P8) tenien un sol genotip. Els pacients P4 i P9 estaven infectats per dos genotips diferents. Els 18 aïllats tenien un total de 6 genotips diferents. El genotip G1 era el més comú afectant 7 pacients. Els genotips G1 i G2 estaven presents també en altres pacients de Brasil no relacionats amb el brot.

El *clade* II es va dividir en dos *subclades* (IIa i IIb) altament suportats (100%). Les soques peruanes, les quals eren les més nombroses després de les del Brasil, es distribuïen en dos branques diferents (IIa-1 i IIb-1) suportada cada una amb un 100% de *bootstrap*. El *subclade* IIa a part de soques del Perú incloïa aïllats d'altres països (Bolívia, Colòmbia i Argentina) i a l'altre branca (IIa-2) situada més distant, una soca d'origen desconegut i la soca tipus d'*S. schenckii*. Una distribució similar es va observar al *subclade* IIb, en el que les soques del Perú formaven una branca (IIb-1) filogenèticament clarament separada de l'altra branca (IIb-2) que comprenia només dos aïllats un de Sud Àfrica i l'altre d'Argentina. Aquest anàlisi confirma l'existència d'un *clade* europeu (*clade* III), el més distanciat filogenèticament.

Taula 3. relacions genètiques entre els aïllats clínics d'*S. schenckii*
del brot d'espótricosi felina

Pacient	aïllats ^a	Data	Genotip (G)
P1	IPEC 16042	29/04/1999	G1
P2	IPEC 16243	11/06/1999	G1
P3	IPEC 16490	09/08/1999	G1
P3	IPEC 16503	12/08/1999	G1
P4	IPEC 16550	19/08/1999	G2
P4	IPEC 16864	04/11/1999	G3
P4	IPEC 16919	22/01/1999	G2
P5	IPEC 15572	19/11/1998	G4
P6	IPEC 16456	29/07/1999	G1
P7	IPEC 17307	16/03/2000	G1
P8	IPEC 17331	19/10/2000	G1
P8	IPEC 17608	01/06/2000	G1
P8	IPEC 17692	16/06/2000	G1
P8	IPEC 17920	17/08/2000	G1
P9	IPEC 17786	13/07/2000	G2
P9	IPEC 17521	04/05/2000	G5
P10	IPEC 17585	25/05/2000	G6
P11	IPEC 22487	30/01/2003	G1

^a IPEC, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil.



Discussió

Aquest estudi és el resultat d'una anàlisi filogenètica del complex d'espècies d'*S. schenckii* a partir de les seqüències d'ADN de tres loci diferents. Un dels resultats més interessants va ser descobrir que els aïllats d'*S. schenckii* pràcticament tots d'origen clínic es distribuïen en sis espècies filogenètiques putatives. Aquestes espècies críptiques eren a la vegada subdividides en grups més petits, això suggeria no només l'existència de poblacions en procés de divergència si no també que cada un d'aquests llinatges a sofert un procés de diferenciació a taxons independents.

Els nostres resultats concorden amb un estudi de Neyra *et al.*(16), qui van analitzar la diversitat genètica de les mateixes soques procedents del Perú que nosaltres vam testar, fent servir AFLP i la seqüenciació de l'ITS2. En aquest estudi les soques s'agrupaven en 2 *clades* similars als obtinguts en els nostres arbres filogenètics.

Un altre aspecte interessant del nostre anàlisi va ser la troballa de que cada un del grups mostrava un cert grau d'especificitat geogràfica, cosa que concorda amb altres autors (14,16). La possible existència de diferents espècies dins *S. schenckii* ja havia sigut suggerida per Wilhelm de Beer *et al.* (27) en base a l'anàlisi de seqüències de la regió ITS d'11 soques clíniques i ambientals de Sud Àfrica. Els nostres resultats no coincideixen amb els d'Ishizaki (10), qui utilitzant anàlisis d'ADNm va trobar que tots els aïllats estudiats (més de 500) pertanyien a la mateixa espècie.

Al nostre estudi, l'anàlisi combinat dels 3 loci va revelar la presència de dos grans grups, un que incloïa els aïllats europeus i l'altre els aïllats de Sud Amèrica i Sud Àfrica (Fig. 1), en aquest últim grup, es van observar dos *clades*, un format per 29 aïllats de Brasil, i el segon per la resta. Aquest resultats concorden amb els de Neyra *et al.* (16), en els quals, per AFLP, els aïllats Europeus de Bèlgica i Itàlia es trobaven molt separats de la resta d'aïllats procedents d'Amèrica. En el nostre estudi un aïllat de Sud Àfrica es trobava proper a un de Sud Amèrica. Aquests resultats concorden amb

Ishizaki *et al.* (11), que van trobar, utilitzant RFLPs de l'ADNm, que els aïllats de Sud Amèrica estudiats estaven relacionats amb d'altres de Sud Àfrica. Els 24 tipus de fragments de restricció descrits es classificaven en dos grans grups filogenètics, un predominat a sud Amèrica i Àfrica i l'altre predominant a Austràlia i Àsia. El patró biogeogràfic mostrat en tots aquests estudis sembla que es relaciona amb els fets associats a la formació de les barreres naturals creades per la fragmentació de l'antic supercontinent Gondwana del període Cretaci superior al període Paleocè fa 100 milions d'anys. O'Donnell *et al.* van proposar això per explicar el procés d'especiació del complex d'espècies *Giberella fujikuroi* (18).

Malgrat la separació genètica és considerable entre els tres majors grups, p. ex.: el *clade* espanyol, el *clade* del Brasil i el *clade* format per la resta de soques de Sud Amèrica, cada un d'ells mostra un alt nivell de clonalitat. Les poblacions primitives eren segurament aïllades per la separació dels continents, i la formació de les barreres naturals van facilitar la seva especiació per convertir-se en hostes endèmics de diferents regions. No obstant, malgrat que la separació geogràfica dels grans grups és evident, els diferents genotips presents en ells, no estan relacionats amb la geografia (16), la qual cosa sembla indicar que hi ha hagut creuaments dins dels aïllats de cada població.

El nostre anàlisi revela que en el brot d'espótricosi del Brasil es troben sis genotips diferents en la mostra de 18 aïllats, la qual cosa demostra que les infeccions no estaven causades per un únic genotip virulent, tal i com s'havia pensat. A la ciutat de Rio de Janeiro i les àrees del voltant, de l'any 1987 al 1997, només es van donar 13 casos de espótricosi humana, però del 1990 al 2004, es van reportar 759 casos en humans (21). És difícil d'explicar aquest increment dramàtic de les infeccions causades per *Sporothrix* en aquesta regió, els investigadors que han reportat tots aquests casos són incapaços de donar una explicació per aquesta epidèmia (21), no obstant, s'ha de remarcar que el major nombre de casos s'han donat en àrees de condicions socioeconòmiques

desprivilegiades, i amb serveis sanitaris precaris. El pacient típic humà són dones, normalment mestresses de casa, la qual cosa és normal si considerem que els membres d'aquest grup són les que més freqüentment estan exposades al fong degut a que tenen cura dels gats (22). Barros *et al.* (1) explicaren l'àmplia disseminació de la malaltia amb factors relacionats amb el comportament dels gats, els quals encara que cohabitin amb els humans, no sempre s'estan a casa i van pel veïnat, veient-se sovint involucrats amb baralles amb altres animals i estan en contacte amb terra i plantes.

En conclusió *S. schenckii* sembla ser que és un complex d'espècies, que de vegades preval en certes zones geogràfiques. Un coneixement més acurat d'aquesta espècie seria de gran interès en medicina, ja que es podrien donar diferents patrons clínics que podrien tenir una resposta diferent davant una teràpia antifúngica. Per exemple, els aïllats del Brasil presenten diferents manifestacions clíniques amb manifestacions immunes (eritema multiforme) (9), lesions cutànies disseminades i formes atípiques (20).

Agraïments

Els autors agraeixen als responsables del Centraalbureau voor Schimmelcultures (Utrecht, Holanda), BCCM™/IHEM Biomedical Fungi and Yeasts Collection (Brussel·les, Bèlgica), J. M. Torres (IMIM, Hospital del Mar, Barcelona, Espanya), C. Rubio (Hospital Universitario Lozano Blesa, Saragossa, Espanya), R. Negróni (Hospital de Infecciosas Francisco Javier Muñiz, Buenos Aires, Argentina) i P. Godoy (Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, Brasil) per cedir-nos la majoria de soques utilitzades en aquest estudi. Aquest treball s'ha realitzat amb el suport del Ministerio de Ciencia y Tecnología espanyol, concessió CGL 2004-00425/BOS.

Referències

1. **Barros, M. B., A. O. Schubach, A. C. do Valle, M. C. Gutierrez Galhardo, F. Conceicao-Silva, T. M. Schubach, R. S. Reis, B. WaDesconegute, K. B. Marzochi, i M. J. Conceicao.** 2004. Cat-transmitted sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brasil: description of a series of cases. *Clin. Infect. Dis.* **38**:529–535.
2. **Carbone, I., i L. M. Kohn.** 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* **91**:553–556.
3. **de Hoog, G. S., J. Guarro, J. Gené, i M. J. Figueras.** 2000. Atlas of clinical fungi, 2nd ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands.
4. **Dettman, J. R., D. J. Jacobson, i J. W. Taylor.** 2003. A multilocus genealogical approach to phylogenetic species recognition in the model eukaryote *Neurospora*. *Evol. Int. J. Org. Evol.* **57**:2703–2720.
5. **Dixon, D. M., I. F. Salkin, R. A. Duncan, N. J. Hurd, J. H. Haines, M. E. Kemna, i F. B. Coles.** 1991. Isolation and characterization of *Sporothrix schenckii* from clinical and environmental sources associated with the largest U.S. epidemic of sporotrichosis. *J. Clin. Microbiol.* **29**:1106–1113.
6. **Ghosh, A., P. K. Maity, B. M. Hemashettar, V. K. Sharma, i A. Chakrabarti.** 2002. Physiological characters of *Sporothrix schenckii* isolates. *Mycoses* **45**:449–454.
7. **Gilgado, F., J. Cano, J. Gené, i J. Guarro.** 2005. Molecular phylogeny of the *Pseudallescheria boydii* species complex: proposal of two new species. *J. Clin. Microbiol.* **43**:4930–4942.

8. **Glass, N., i G. Donaldson.** 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:1323–1330.
9. **Gutierrez-Galhardo, M. C., M. B. Barros, A. O. Schubach, T. Cuzzi, T. M. Schubach, M. S. Lazera, i A. C. Valle.** 2005. Erythema multiforme associated with sporotrichosis. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **19**:507–509.
10. **Ishizaki, H.** 2003. Mitochondrial DNA analysis of *Sporothrix schenckii*. *Jpn. J. Med. Mycol.* **44**:155–157.
11. **Ishizaki, H., M. Kawasaki, M. Aoki, T. Matsumoto, A. A. Padhye, M. Mendoza, i R. Negroni.** 1998. Mitochondrial DNA analysis of *Sporothrix schenckii* in North and South America. *Mycopathologia* **142**:115–118.
12. **Kishino, H., i M. Hasegawa.** 1989. Evaluation of the maximum likelihood estimate of the evolutionary tree topologies from DNA sequence data, and the branching order in Hominoidea. *J. Mol. Evol.* **29**:170–179.
13. **Mayden, R. L.** 1997. A hierarchy of species concepts: the denouement in the saga of the species problem, p. 381–424. *In* M. F. Claridge, H. A. Dawah, and M. R. Wilson (ed.), *Species: the units of biodiversity*. Chapman & Hall, London, United Kingdom.
14. **Mesa-Arango, A. C., M. R. Reyes-Montes, A. Pérez-Mejía, H. Navarro-Barranco, V. Souza, G. Zúñiga, i C. Toriello.** 2002. Phenotyping and genotyping of *Sporothrix schenckii* isolates according to geographic origin and clinical form of sporotrichosis. *J. Clin. Microbiol.* **40**:3004–3011.

15. **Nei, M., i T. Gojobori.** 1986. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Mol. Biol. Evol.* **3**:418–426.
16. **Neyra, E., P. Fonteyne, D. Swinne, F. Fauche, B. Bustamante, i N. Nolard.** 2005. Epidemiology of Esporotricosi humana investigated by amplified fragment length polymorphism. *J. Clin. Microbiol.* **43**:1348–1352.
17. **O'Donnell, K.** 2000. Molecular phylogeny of the *Nectria haematococca-Fusarium solani* species complex. *Mycologia* **92**:919–938.
18. **O'Donnell, K., E. Cigelnik, i H. I. Nirenberg.** 1998. Molecular systematics and phytogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia* **90**:465–493.
19. **Rozas, J., J. C. Sanchez del Barrio, X. Messeguer, i R. Rozas.** 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* **19**:2496–2497.
20. **Schubach, A., M. B. de Lima Barros, T. M. Schubach, A. C. Francesconi-do-Valle, M. C. Gutierrez-Galhardo, M. Sued, M. de Matos Salgueiro, P. C. Fialho-Monteiro, R. S. Reis, K. B. Marzochi, B. WaDesconegute, i F. Conceicao-Silva.** 2005. Primary conjunctival sporotrichosis: two cases from a zoonotic epidemic in Rio de Janeiro, Brasil. *Cornea* **24**:491–493.
21. **Schubach, A., T. M. Schubach, i M. B. L. Barros.** 2005. Epidemic cattransmitted sporotrichosis. *N. Engl. J. Med.* **353**:1185–1186.

22. **Schubach, A., T. M. Schubach, M. B. L. Barros, i B. WaDesconegute.** 2005. Cat-transmitted sporotrichosis, Rio de Janeiro, Brasil. *Emerg. Infect. Dis.* **11**:1952–1954.
23. **Swofford, D. L.** 2001. PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). (version 4.0). Sinauer Associates, Sunderland, Mass.
24. **Taylor, J. W., D. J. Jacobson, S. Kroken, T. Kasuga, D. M. Geiser, D. S. Hibbett, i M. C. Fisher.** 2000. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genet. Biol.* **31**:21–32.
25. **Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, i D. G. Higgins.** 1997. The ClustalX Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **24**:4876–4882.
26. **Travassos, L. R., i K. O. Lloyd.** 1980. *Sporothrix schenckii* and related species of *Ceratocystis*. *Microbiol. Rev.* **44**:683–721.
27. **Wilhelm de Beer, Z., T. C. Harrington, H. F. Vismer, B. D. Wingfield, i M. J. Wingfield.** 2003. Phylogeny of the *Ophiostoma stenoceras-Sporothrix schenckii* complex. *Mycologia* **95**:434–441.

4.2 *S. brasiliensis*, *S. globosa* i *S. mexicana*, tres noves espècies d'*Sporothrix* d'interès clínic

Aquest estudi va ser publicat al *Journal of Clinical Microbiology* 45:3198-3206, 2007 (veure Annex 3) amb el format de treball original que es mostra a continuació.

Resum

Sporothrix schenckii és l'espècie responsable de l'espótricosi, infecció fúngica causada per la implantació traumàtica d'aquest fong dimòrfic. Estudis moleculars recents han demostrat que aquesta espècie constitueix un complex de nombroses espècies filogenètiques. Ja que la delimitació d'aquestes espècies podria ser de gran importància des d'un punt de vista clínic, hem estudiat 127 soques, la majoria de les quals es van rebre com a *S. schenckii*, incloent les soques tipus disponibles d'espècies actualment considerades sinònimes així com espècies relacionades morfològicament. Hem caracteritzat fenotípicament tots aquests aïllats, utilitzant diferents medis de cultiu, rangs de creixement a diferents temperatures, nombrosos tests nutricionals, i vam comparar les seqüències del gen de la calmodulina. L'anàlisi molecular va revelar que *Sporothrix albicans*, *Sporothrix inflata* i *S. schenckii* var. *luriei* són espècies clarament diferents de *S. schenckii*. La combinació dels descobriments genètics i fenètics ens van permetre proposar les noves espècies *Sporothrix brasiliensis*, *Sporothrix globosa* i *Sporothrix mexicana*.

Introducció

Sporothrix schenckii és el fong patògen causant de l'esperotricosi, una infecció severa normalment adquirida per la inoculació traumàtica de materials colonitzats o per la inhalació d'espores a través del tracte respiratori (3,6). La forma cutaneo-limfàtica és la manifestació més comú, encara que es donen altres tipus de manifestacions com la infecció disseminada. L'esperotricosi és de distribució mundial, però es troba especialment en zones tropicals i subtropicals. L'hàbitat natural d'*S. schenckii* és el terra i les plantes. El teleomorf d'aquest fong encara no s'ha descobert, encara que hi ha una estreta relació entre *S. schenckii* i el gènere ascomicet *Ophiostoma* (2,3). Contràriament als suggeriments inicials *Ophiostoma stenoceras* no és el teleomorf d'aquest fong (4, 8, 27, 30). En els últims anys, s'han realitzat nombrosos estudis moleculars amb *S. schenckii* (13, 15, 22, 23, 25, 32, 34) i han demostrat una clara existència de grups genèticament diferents. En un estudi multilocus recent, vam investigar l'estructura poblacional d'*S. schenckii* i es va demostrar l'existència d'almenys 6 espècies filogenètiques putatives, prevalents en diferents regions geogràfiques (20). En diversos estudis *in vitro* de sensibilitat als antifúngics de soques clíniques d'*S. schenckii*, s'ha demostrat un ampli rang de sensibilitat a diferents antifúngics (16, 21, 31). Això sembla indicar que aquests aïllats podrien representar espècies diferents, si això és així el fet de conèixer les diferents respostes als antifúngics seria crític pel correcte tractament del pacient.

L'objectiu del present estudi va ser caracteritzar fenotípicament les diferents espècies filogenètiques del complex d'*S. schenckii* per tal de trobar característiques morfològiques i/o fisiològiques que permetessin el seu reconeixement en un laboratori clínic. Només una identificació fiable ens permetrà estudiar la seva epidemiologia i determinar si es troben patrons clínics diferents associats a les diferents espècies. S'ha incrementat el nombre de soques per tal d'augmentar la solidesa dels diferents grups que representen diferents espècies en el complex. Aquests aïllats es van

assignar a diferents llinatges en base a la seqüència del gen de la calmodulina (CAL), el locus més informatiu trobat en el nostre estudi anterior (20).

Materials i mètodes

Aïllats fúngics. Es van incloure a l'estudi cent vint-i-set aïllats (Taula 1). Tots ells identificats morfològicament com a *S. schenckii* (la majoria d'origen clínic), la soca tipus *S. schenckii* var.*luriei*, les soques tipus disponibles d'espècies actualment considerades com a sinònims d'*S. schenckii* (*S. albicans*, *Sporotrichum tropicale* i *Dolichoascus schenckii*), i la soca tipus d' *S. inflata*, l'espècie morfològicament més relacionada a *S. schenckii*. Els aïllats es van guardar en agar de dextrosa patata (PDA; Difco Laboratories, Detroit, Mich.) a 4-7°C i en tubs inclinats de PDA submergits en oli mineral a temperatura ambient.

Extracció d'ADN, amplificació i seqüenciació. Els procediments que es van seguir per a l'extracció d'ADN, l'amplificació, la seqüenciació i l'anàlisi filogenètic del gen de la calmodulina (CAL) van ser els descrits per Marimon *et al.* (19). Els cebadors utilitzats van ser CL1 i CL2A (24). L'anàlisi filogenètic es va realitzar utilitzant el programa PAUP* versió 4.0b10 (28). Els arbres més parsimoniosos (MPT) van ser els obtinguts amb una cerca heurística de 100 repeticions amb l'addició aleatòria de taxons i amb intercanvi de branques del tipus TBR, es va deixar l'opció Multrees per defecte i es van colapsar les branques amb longitud màxima igual a zero. Totes les seqüències es van dipositar a la base de dades del EMBL (Taula 1).

Taula 1. Espècies fúngiques, origen i nº d'accés al GenBank/EMBL/DBJ dels aïllats inclosos a l'estudi

Espècies	Rebut com a	Aïllat	Origen	Nº d'accés	
				CAL	
<i>S. albicans</i>	<i>S. schenckii</i>	CBS 302.73 T	Ambiental, terra, Regne Unit	AM398396 ^a	
<i>S. albicans</i>	<i>S. albicans</i>	CBS 111110	Zootermopsis nevadensis, Alemanya	AM398382 ^a	
<i>S. brasiliensis</i>	<i>S. schenckii</i>	CBS 120339 T (=IPEC 16390)	Clinica, Brasil	AM116899	
<i>S. brasiliensis</i>	<i>S. schenckii</i>	IPEC 15572	Clinica, Brasil	AM116886	
<i>S. brasiliensis</i>	<i>S. schenckii</i>	IPEC 16042	Clinica, Brasil	AM116885	
<i>S. brasiliensis</i>	<i>S. schenckii</i>	IPEC 16243	Clinica, Brasil	AM116877	
<i>S. brasiliensis</i>	<i>S. schenckii</i>	IPEC 16456	Clinica, Brasil	AM116897	
<i>S. brasiliensis</i>	<i>S. schenckii</i>	IPEC 16503	Clinica, Brasil	AM116875	
<i>S. brasiliensis</i>	<i>S. schenckii</i>	IPEC 16550	Clinica, Brasil	AM116892	
<i>S. brasiliensis</i>	<i>S. schenckii</i>	IPEC 16864	Clinica, Brasil	AM116889	
<i>S. brasiliensis</i>	<i>S. schenckii</i>	IPEC 16919	Clinica, Brasil	AM116898	
<i>S. brasiliensis</i>	<i>S. schenckii</i>	IPEC 17307	Clinica, Brasil	AM116896	
<i>S. brasiliensis</i>	<i>S. schenckii</i>	IPEC 17331	Clinica, Brasil	AM116880	
<i>S. brasiliensis</i>	<i>S. schenckii</i>	IPEC 17521	Clinica, Brasil	AM116874	
<i>S. brasiliensis</i>	<i>S. schenckii</i>	IPEC 17585	Clinica, Brasil	AM116887	
<i>S. brasiliensis</i>	<i>S. schenckii</i>	IPEC 17608	Clinica, Brasil	AM116890	
<i>S. brasiliensis</i>	<i>S. schenckii</i>	IPEC 17692	Clinica, Brasil	AM159127	
<i>S. brasiliensis</i>	<i>S. schenckii</i>	IPEC 17786	Clinica, Brasil	AM116884	
<i>S. brasiliensis</i>	<i>S. schenckii</i>	IPEC 17920	Clinica, Brasil	AM116888	
<i>S. brasiliensis</i>	<i>S. schenckii</i>	IPEC 17943	Clinica, Brasil	AM116878	
<i>S. brasiliensis</i>	<i>S. schenckii</i>	IPEC 22468	Clinica, Brasil	AM116882	
<i>S. brasiliensis</i>	<i>S. schenckii</i>	IPEC 22493.1	Clinica, Brasil	AM116894	
<i>S. brasiliensis</i>	<i>S. schenckii</i>	IPEC 22493.2	Clinica, Brasil	AM116883	
<i>S. brasiliensis</i>	<i>S. schenckii</i>	IPEC 22496.4	Clinica, Brasil	AM116895	
<i>S. brasiliensis</i>	<i>S. schenckii</i>	IPEC 22496.5	Clinica, Brasil	AM116879	
<i>S. brasiliensis</i>	<i>S. schenckii</i>	IPEC 22543.2	Clinica, Brasil	AM116881	
<i>S. brasiliensis</i>	<i>S. schenckii</i>	IPEC 22582	Clinica, Brasil	AM116891	
<i>S. brasiliensis</i>	<i>S. schenckii</i>	IPEC 22593	Clinica, Brasil	AM116893	
<i>S. brasiliensis</i>	<i>S. schenckii</i>	FMR 8337	Ambiental, pols, Brasil	AM116876	
<i>S. brasiliensis</i>	<i>S. schenckii</i>	FMR 9034	Clinica, Brasil	AM261688	
<i>S. brasiliensis</i>	<i>S. schenckii</i>	FMR 9035	Clinica, Brasil	AM261689	
<i>S. globosa</i>	<i>S. schenckii</i>	CBS 120340 T (=FMR 8600)	Clinica, Espanya	AM116908	
<i>S. globosa</i>	<i>Sporotrichum tropicale^b</i>	CBS 292.55 T	Clinica, Regne Unit	AM490354 ^a	
<i>S. globosa</i>	<i>S. schenckii</i>	FMR 8594	Clinica, Espanya	AM116906	

Taula 1. Espècies fúngiques, origen i nº d'accés al GenBank/EMBL/DBJ dels aïllats inclosos a l'estudi (cont.)

Espècies	Rebut com a	Aïllat	Origen	Nº d'accés	
				CAL	
<i>S. globosa</i>	<i>S. schenckii</i>	FMR 8595	Clínica, Espanya	AM116905	
<i>S. globosa</i>	<i>S. schenckii</i>	FMR 8596	Clínica, Espanya	AM116902	
<i>S. globosa</i>	<i>S. schenckii</i>	FMR 8597	Clínica, Espanya	AM116907	
<i>S. globosa</i>	<i>S. schenckii</i>	FMR 8598	Clínica, Espanya	AM116903	
<i>S. globosa</i>	<i>S. schenckii</i>	FMR 8601	Clínica, Espanya	AM116901	
<i>S. globosa</i>	<i>S. schenckii</i>	FMR 8602	Clínica, Espanya	AM116909	
<i>S. globosa</i>	<i>S. schenckii</i>	FMR 9020	Clínica, Japó	AM398994 ^a	
<i>S. globosa</i>	<i>S. schenckii</i>	FMR 9021	Clínica, Japó	AM398993 ^a	
<i>S. globosa</i>	<i>S. schenckii</i>	FMR 9022	Clínica, Japó	AM398995 ^a	
<i>S. globosa</i>	<i>S. schenckii</i>	FMR 9023	Clínica, Japó	AM399016 ^a	
<i>S. globosa</i>	<i>S. schenckii</i>	KMU 4208	Ambiental, blat, Xina	AM399002 ^a	
<i>S. globosa</i>	<i>S. schenckii</i>	KMU 4214	Ambiental, jonc, Xina	AM399003 ^a	
<i>S. globosa</i>	<i>S. schenckii</i>	KMU 4200	Ambiental, jonc, Xina	AM399004 ^a	
<i>S. globosa</i>	<i>S. schenckii</i>	KMU 4210	Ambiental, terra, Xina	AM399005 ^a	
<i>S. globosa</i>	<i>S. schenckii</i>	KMU 4116	Ambiental, Xina	AM399019 ^a	
<i>S. globosa</i>	<i>S. schenckii</i>	IHEM 4178	Clínica, Italia	AM399018 ^a	
<i>S. globosa</i>	<i>S. schenckii</i>	UTHSC 04-1485	Clínica, EUA	AM399015 ^a	
<i>S. globosa</i>	<i>S. schenckii</i>	UTHSC 05-127	Clínica, EUA	AM398992 ^a	
<i>S. globosa</i>	<i>S. schenckii</i>	UTHSC 99-625	Clínica, EUA	AM398982 ^a	
<i>S. globosa</i>	<i>S. schenckii</i>	MCCL 220029	Clínica, Índia	AM490358 ^a	
<i>S. globosa</i>	<i>S. schenckii</i>	MCCL 220087	Clínica, Índia	AM490359 ^a	
<i>S. globosa</i>	<i>S. schenckii</i>	MCCL 220038	Clínica, Índia	AM490360 ^a	
<i>S. globosa</i>	<i>S. schenckii</i>	MCCL 220045	Clínica, Índia	AM490361 ^a	
<i>S. globosa</i>	<i>S. schenckii</i>	MCCL 220082	Clínica, Índia	AM490362 ^a	
<i>S. globosa</i>	<i>S. schenckii</i>	MCCL 220084	Clínica, Índia	AM490363 ^a	
<i>S. globosa</i>	<i>S. schenckii</i>	MCCL 220040	Clínica, Índia	AM490348 ^a	
<i>S. globosa</i>	<i>S. schenckii</i>	MCCL 220011	Clínica, Índia	AM490349 ^a	
<i>S. globosa</i>	<i>S. schenckii</i>	MCCL 220030	Clínica, Índia	AM490350 ^a	
<i>S. globosa</i>	<i>S. schenckii</i>	MCCL 220049	Clínica, Índia	AM490351 ^a	
<i>S. globosa</i>	<i>S. schenckii</i>	MCCL 220010	Clínica, Índia	AM490352 ^a	
<i>S. globosa</i>	<i>S. schenckii</i>	MCCL 220085	Clínica, Índia	AM490353 ^a	
<i>S. globosa</i>	<i>S. schenckii</i>	NBRC 5984	Desconegut	AM116900	
<i>S. globosa</i>	<i>S. schenckii</i>	NBRC 6072	Desconegut	AM116904	
<i>S. inflata</i>	<i>S. inflata</i>	CBS 239.68 T	Ambiental, camp de blat, Alemanya	-	
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	CBS 359.36 T	Clínica, EUA	AM117437	

Taula 1. Espècies fúngiques, origen i nº d'accés al GenBank/EMBL/DBJ dels aïllats inclosos a l'estudi (cont.)

Espècies	Rebut com a	Aïllat	Origen	Nº d'accés	
				CAL	
<i>S. schenckii</i>	<i>Dolichoascus schenckii</i> ^b	CBS 938.72 T	Clínica, França	AM490340 ^a	
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	NBRC 8158	Desconegut	AM117438	
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	FMR 8604	Clínica, Perú	AM117429	
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	FMR 8605	Clínica, Perú	AM117442	
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	FMR 8606	Clínica, Perú	AM117431	
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	FMR 8607	Clínica, Perú	AM117428	
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	FMR 8608	Clínica, Perú	AM117441	
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	FMR 8609	Clínica, Perú	AM117439	
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	FMR 8677	Clínica, Argentina	AM117436	
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	FMR 8678	Clínica, Argentina	AM117446	
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	FMR 8679	Clínica, Argentina	AM117445	
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	FMR 8716	Clínica, Perú	AM399006 ^a	
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	FMR 8717	Clínica, Perú	AM399017 ^a	
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	FMR 9051	Clínica, Venezuela	AM490342 ^a	
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	FMR 9052	Clínica, Venezuela	AM490341 ^a	
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	FMR 9054	Clínica, Venezuela	AM490343 ^a	
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	FMR 9055	Clínica, Venezuela	AM490344 ^a	
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	FMR 9113	Clínica, Venezuela	AM490345 ^a	
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	FMR 9114	Clínica, Venezuela	AM490346 ^a	
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	FMR 9115	Clínica, Venezuela	AM490347 ^a	
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	FMR 9275	Clínica, Venezuela	AM490355 ^a	
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	FMR 9276	Clínica, Venezuela	AM490356 ^a	
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	FMR 9277	Clínica, Venezuela	AM490357 ^a	
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	FMR 9278	Clínica, Venezuela	AM490337 ^a	
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	FMR 9279	Clínica, Venezuela	AM490338 ^a	
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	FMR 9280	Clínica, Venezuela	AM490339 ^a	
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	IHEM 3774	Clínica, Colòmbia	AM117447	
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	IHEM 3787	Desconegut, Sud Àfrica	AM117435	
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	IHEM 15477	Clínica, Bolívia	AM117444	

Taula 1. Espècies fúngiques, origen i nº d'accés al GenBank/EMBL/DBJ dels aïllats inclosos a l'estudi (cont.)

Espècies	Rebut com a	Aïllat	Origen	Nº d'accés	
				CAL	CAL
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	IHEM 15486	Clínica, Perú	AM117432	
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	IHEM 15489	Clínica, Perú	AM117430	
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	IHEM 15499	Clínica, Perú	AM117434	
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	IHEM 15502	Clínica, Perú	AM117427	
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	IHEM 15503	Clínica, Perú	AM117433	
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	IHEM 15508	Clínica, Perú	AM117443	
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	IHEM 15511	Clínica, Perú	AM117440	
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	UTHSC 05-2843	Clínica, EUA	AM399012 ^a	
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	UTHSC 05-802	Clínica, EUA	AM399008 ^a	
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	UTHSC 04-2235	Clínica, EUA	AM398984 ^a	
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	UTHSC 04-1718	Clínica, EUA	AM398990 ^a	
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	UTHSC 04-1064	Clínica, EUA	AM399014 ^a	
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	UTHSC 04-1012	Clínica, EUA	AM399020 ^a	
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	UTHSC 04-771	Clínica, EUA	AM398985 ^a	
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	UTHSC 04-797	Clínica, EUA	AM399013 ^a	
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	UTHSC 03-3124	Clínica, EUA	AM398996 ^a	
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	UTHSC 03-1684	Clínica, EUA	AM398989 ^a	
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	UTHSC 03-1627	Clínica, EUA	AM398987 ^a	
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	UTHSC 03-823	Clínica, EUA	AM398991 ^a	
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	UTHSC 02-2723	Clínica, EUA	AM399007 ^a	
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	UTHSC 02-510	Clínica, EUA	AM398986 ^a	
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	UTHSC 01-2137	Clínica, EUA	AM398983 ^a	
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	UTHSC 00-1734	Clínica, EUA	AM398988 ^a	
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	UTHSC 00-1488	Clínica, EUA	AM399009 ^a	
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	UTHSC 00-603	Clínica, EUA	AM399010 ^a	
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	UTHSC 99-173	Clínica, EUA	AM399011 ^a	
<i>S. schenckii</i> var. <i>luriei</i>	<i>S. schenckii</i> var. <i>luriei</i>	CBS 937.72 T	Clínica, Sud Àfrica	-	
<i>S. mexicana</i>	<i>S. schenckii</i>	CBS 120341 T	Ambiental, terra roser , Mèxic	AM398393 ^a	
<i>S. mexicana</i>	<i>S. schenckii</i>	CBS 120342	Ambiental, fulles de clavell, Mèxic	AM398392 ^a	

Abreviatura utilitzada : IPEC, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fiocruz, Brasil; FMR, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Reus, Espanya ; IHEM, The BCCM™/IHEM biomedical fungi and yeasts collection, Bèlgica; CBS, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Holanda; NBRC, Biological Resource Center - Chiba, Japó; KMU Kanazawa Medical University, Ishikawa, Japó; UTHSC Fungus Testing Laboratory, University of Texas Health Science Center, EUA; MCCL, Mycology Culture Collection Laboratory, Postgraduate Institute of Medical Education and Research, Chandigarh, India; CAL, gen de la calmodulina; T soca tipus.^a seqüències generades per aquest estudi; ^b espècies publicades invàlidament.

Estudis morfològics. Per tal d'estudiar les característiques microscòpiques i d'espulació (5, 8, 22), tots els aïllats es van sembrar en PDA, agar de farina de morenc (CMA; 30 g morenc, 15 g agar, 1 L d'aigua) i agar de farina de civada (OA; 30 g farina de civada, 1 g MgSO_4 , 1.5 g KH_2PO_4 , 15 g agar, 1 L d'aigua) i es va incubar a 30°C en la foscor. Les característiques microscòpiques bàsicament es van determinar en microcultius de CMA al cap de 10-12 dies d'incubació a 30°C. Les preparacions es van muntar en àcid làctic i es van examinar amb el microscopi (Leitz Dialux 20). Al menys es van prendre 25 mesures considerant els valors màxims i mínims de cada tipus d'estructura.

Estudis fisiològics. A l'estudi es van incloure la taxa de creixement a diverses temperatures (20, 25, 30, 35, 37 i 40°C) de tots els aïllats en PDA. Les plaques de Petri s'inoculaven al centre amb petites porcions del fong d'aproximadament 1 mm de diàmetre. El diàmetre de les colònies (en mil·límetres) es mesurava als 14 i 21 dies d'incubació. La mitjana dels diàmetres es va determinar per tal de detectar diferències entre els aïllats.

Es va testar l'assimilació de 35 fonts de carboni i 7 de nitrogen en medi líquid segons el procediment descrit per Yarrow (33). Els test es van realitzar en microplaques de 96 pouets, cada columna contenia 150 µl de medi líquid de nitrogen base (Becton Dickinson Co, Sparks, Maryland) o de carboni base (Becton Dickinson Co), amb un dels substrats a testar, excepte pels controls negatius, que només contenien el medi base, i els controls positius que contenien glucosa. S'afegien 50 µl d'inòcul a cada uns dels pouets. Els inòculs s'ajustaven per densitat òptica amb un rang de 0.21 a 0.29, el qual correspon a un inòcul final a la microplaca de 2×10^5 a 2×10^6 UFC/ml. La viabilitat dels conidis es verificava sembrant en placa 100 µl de dilucions seriades de cada inòcul en PDA. Les microplaques es van llegir als 5 i 10 dies d'incubació a 25°C. La presència d'ureasa es va determinar després d'inocular tubs inclinats amb el medi agar d'urea de Christensen, i deixar incubar a 25°C durant 8 dies. La producció d'ureasa es va detectar

pel desenvolupament d'un color rosa. La producció d'àcids es va provar en *chalk agar* (50 g glucosa, 5 g CaCO_3 , 5 g extracte de llevat, 20 g agar i 1 L d'aigua) es va incubar a 25°C, els cultius es van examinar regularment durant un total de 4 setmanes, per tal de detectar un aclariment del medi al voltant del lloc de sembra (33). El líquat de la gelatina es va testar en un medi compost de 100 g gelatina, 5 g glucosa, 6.7 g medi nitrogen base i 1 L d'aigua, es va incubar a 25°C durant 60 dies (33). Després de la incubació, els tubs es van refrigerar durant 1h a 4°C per poder testar la hidròlisi de la gelatina. La tolerància al NaCl , MgCl_2 i a la cicloheximida es va testar igual com per a l'assimilació de les fonts de carboni i de nitrogen, però en medi nitrogen base suplementat amb un 5% de glucosa (7). Les concentracions finals van ser de 0.1%, 0.25% i 1%, per la cicloheximida, i de 2%, 5%, i 10% pel NaCl i el MgCl_2 . Els resultats es van llegir als 7 i 14 dies d'incubació a 25°C. La formació extracel·lular de polisacàrids es va realitzar en un medi específic d'agar en plaques Petri, incubades a 25°C durant 2-3 setmanes, aleshores es van cobrir amb Lugol i es va observar si es produïa un color blau verdós al voltant de la colònia (33). L'habilitat de transformar-se a la fase llevaduriform es va realitzar seguint el procediment descrit per Ghosh *et al.* (9). Els cultius miceliars sembrats en PDA es semblaven en agar d'infusió de cervell i cor amb un 5% de sang de corder, s'incubava a 37°C durant 6-9 dies i es feien ressembres successives fins aconseguir la fase de llevat. La morfologia de les cèl·lules llevaduriforms es va examinar utilitzant com a medi de muntatge àcid làctic al 85%.

Resultats

Filogènia. Amb els cebadors utilitzats, vam ser capaços d'amplificar i seqüenciar 688 pb del locus de la CAL. Els anàlisis de parsimònia d'aquest gen van donar lloc a 5000 arbres de 278 passos de longitud amb 20 nodes amb un 100% d'índex de *bootstrap*. Tots els arbres tenien un índex de consistència de 0.8885, un índex de retenció de 0.9869, i un índex

d'homoplasia de 0.1115. En aquest fragment es van trobar 474 posicions constants, 180 parsimonic informatives i 34 de variables parsimonic no informatives, que van resultar en un total de 45 genotips. Un dels arbres més parsimoniosos es mostra a la Fig. 1. Els aïllats es van distribuir en cinc grups principals (*clades* I a V) que estaven ben suportats estadísticament (amb un 100% d'índex de *bootstrap*). Els tres primers grups (*clades* I a III) estaven formats per aïllats d'origen clínic, corresponent als mateixos llinatges obtinguts en l'estudi previ que havíem realitzat (20). El *clade* I agrupava només aïllats del Brasil. El *clade* II incloïa pràcticament tots els aïllats d'Amèrica. Tal i com passava en el nostre treball anterior (20), el *clade* II es trobava a la vegada dividit en dos *subclades* altament suportats (*subclade* IIa i IIb). El primer *subclade* agrupava la majoria dels aïllats dels EUA i de Sud Amèrica (Argentina, Bolívia, Colòmbia, Perú i Veneçuela), i les soques tipus d'*S. schenckii* i *Dolichoascus schenckii*, mentre que el *subclade* IIb incloïa la resta d'aïllats de Sud Amèrica (Perú i Argentina) i l'únic aïllat de Sud Àfrica. El *clade* III estava comprès per aïllats de Xina, Índia, Itàlia, Japó, Espanya, EUA i la soca tipus de *Sporotrichum tropicale* procedent d'Anglaterra. Els dos *clades* basals, *clade* IV i V, els formaven quatre soques d'origen ambiental. El *clade* IV agrupava dos soques de Mèxic i el *clade* V agrupava dos aïllats identificats com a *S. albicans*, d'Anglaterra (la soca tipus) i d'Alemanya. La única soca existent d'*S. schenckii* var. *luriei* i la soca tipus d'*S. inflata* no es van poder incloure en l'arbre filogenètic degut a que la baixa especificitat del primer degenerat CL1 va fer que obtinguéssim una seqüència més curta (uns 300 pb). No obstant, la llargada de les seqüències va ser suficientment informativa per veure que els dos taxons es trobaven genèticament distants de la resta d'aïllats inclosos a l'estudi.

Estudis fisiològics. Tots els aïllats van demostrar un creixement òptim entre els 20 i 30°C, i cap va poder créixer a 40°C. Els aïllats dels *clades* IV i V van créixer més ràpidament a 20°C i a 30°C, i els del *clade* I van mostrar el creixement més restringit a les mateixes temperatures. Tots els aïllats van poder créixer a 35°C; no obstant, els dels *clades* III i IV van mostrar un

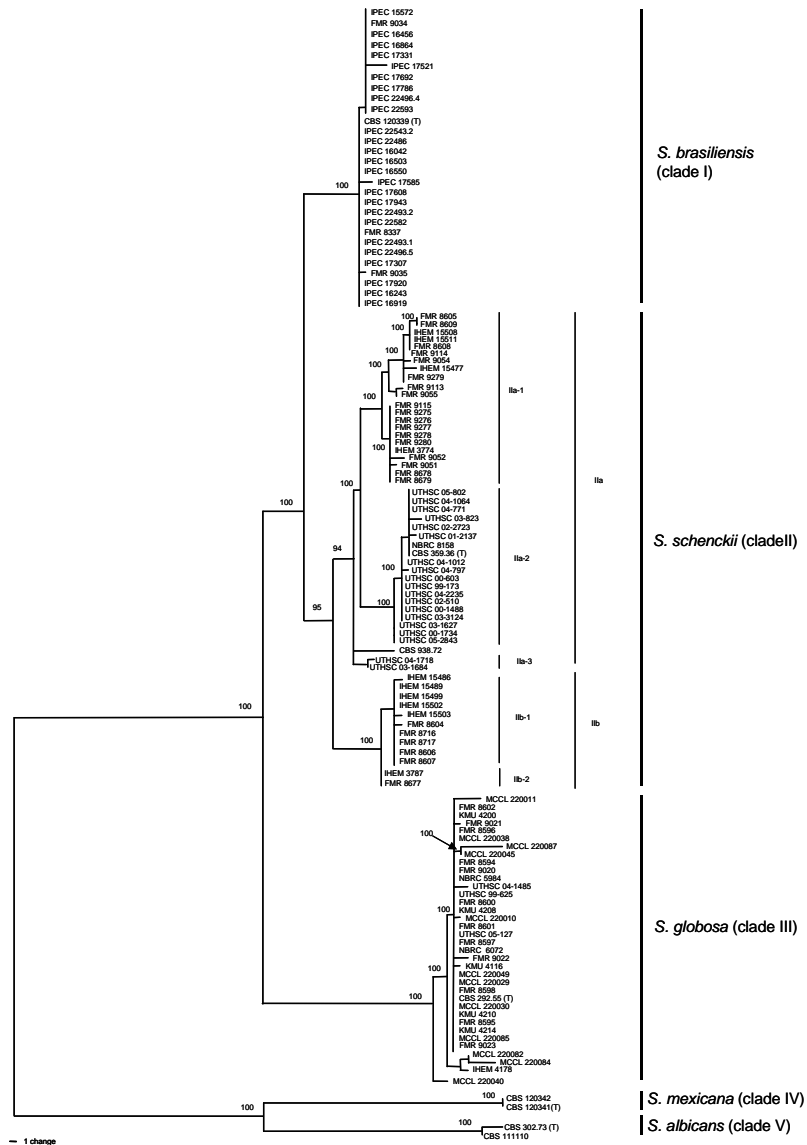


Fig. 1. Un dels 5000 arbres més parsimoniosos obtingut de la cerca heurística, de l'anàlisi de les dades combinades dels tres gens. Els índex de *bootstrap* superiors al 90% s'indiquen als nodes; (T) soques tipus.

creixement més restringit. Quasi tots els aïllats van créixer a 37°C, excepte la majoria d’aïllats del *clade* III. La mitja dels diàmetres de les colònies dels aïllats dels diferents *clades* a les diferents temperatures es resumeix a la Taula 2.

Taula 2. Mitjana del diàmetre de les colònies en PDA als 21 dies dels aïllats del complex d’espècies d’*S. schenckii*

		Temperatura			
<i>Clade</i>	Espècie	20°C	30°C	35°C	37°C
I	<i>S. brasiliensis</i>	24.7 ± 6.1 ^a	24.7 ± 5.5	16.6 ± 5.9	7.6 ± 1.6
IIa	<i>S. schenckii</i>	28.9 ± 5.4	36.0 ± 5.5	21.3 ± 7.0	6.1 ± 3.0
IIb	<i>S. schenckii</i>	30.1 ± 3.0	33.6 ± 3.0	20.8 ± 3.5	5.9 ± 1.6
III	<i>S. globosa</i>	28.5 ± 7.0	30.9 ± 5.0	11.5 ± 5.3	0.4 ± 0.5
IV	<i>S. mexicana</i>	53.5 ± 0.7	67.5 ± 2.1	10.8 ± 0.4	1.8 ± 0.4
V	<i>S. albicans</i>	51.0 ± 2.8	67.0 ± 4.2	28.0 ± 1.4	4.2 ± 1.4

^aMitjana (en mm) ± desviacions estàndard.

Un nombre molt elevat de fonts de carboni i de nitrogen es van assimilar per tots els aïllats testats, sense trobar diferències entre ells (resultats no mostrats). Les variacions més importants es van observar en l’assimilació de la sacarosa, rafinosa i ribitol (Taula 3). Tots els aïllats van ser capaços d’hidrolitzar l’urea als 8 dies d’incubació, cap va produir polisacàrids extracel·lulars, i es van obtenir resultat variables per la producció d’àcids i

de gelatinasa. Tots els aïllats van tolerar concentracions de cicloheximida al 0.25% i de MgCl₂ al 10%. Es van obtenir resultats variables per la tolerància de diferents concentracions de NaCl entre aïllats d'un mateix *clade* (dades no mostrades).

La majoria dels aïllats van ser capaços de convertir-se almenys parcialment a la fase de llevat, no es van observar diferències significants entre els *clades*.

Taula 3. Trets fisiològics claus per a la diferenciació dels *clades* del complex d'espècies d'*S. schenckii*

<i>Clade</i>	<i>Species</i>	Tests fisiològics		
		Sacarosa	Rafinosa	Ribitol
I	<i>S. brasiliensis</i>	0 ^a	0	18.5
IIa	<i>S. schenckii</i>	100	100	100
IIb	<i>S. schenckii</i>	100	100	33.3
III	<i>S. globosa</i>	100	0	90.9
IV	<i>S. mexicana</i>	100	100	100
V	<i>S. albicans</i>	100	0	50

^aPercentatge d'aïllats que assimilen la font de carboni.

Estudi morfològic. La morfologia microscòpica dels aïllats va ser similar independentment del medi de cultiu. Als 21 dies d'incubació, les colònies en PDA eren de taronja pàl·lid a taronja fosc, i en CMA i OA, eren de marró a marró fosc. Amb excepció del *clade* V i de dos aïllats del *clade* IIa (CBS 359.36, la soca tipus d'*S. schenckii*, i NBRC 8158), on les colònies van romandre sense color. Degut a que tots els aïllats van esporular

considerablement millor en CMA que ens els altres medis testats i que no es van observar diferències a 25 i 30°C, aquests medi de cultiu incubat a 30°C, es va utilitzar per comparar les característiques microscòpiques entre els *clades*. Pràcticament tots els aïllats van desenvolupar agrupaments de conidis terminals o intercalats en conidiòfors més o menys diferenciats. Els conidis es produïen simpodialment en cèl·lules conidiògenes denticulades. Aquests conidis eren hialins o lleugerament pigmentats, generalment ovoides o en forma de pera, i mesuraven de 2 a 8 µm de llarg per 1.5 a 2.5 µm d'ample. A més, tots els aïllats produïen un altre tipus de conidi, els quals tenien la paret més gruixuda, de color marró fosc i normalment naixien individualment en denticles curts a les hifes vegetatives. Aquests conidis, coneguts com a conidis sèssils, mesuraven de 2 a 6 µm de llarg per 2 a 3.5 µm d'ample, i mostraven diferents formes entre els *clades*. La presència o absència d'aquests conidis sèssils i la seva morfologia són clau per tal de caracteritzar els diferents *clades* obtinguts a l'anàlisi filogenètic. Els *clades* I i III mostraven conidis sèssils de globosos a subglobosos (Fig. 2A i D). La majoria dels aïllats del *clade* II, produïen en major o menor quantitat conidis sèssils triangulars o cuneiforms (Fig. 2B). Només dos aïllats d'aquest *clade* (FMR 8677 i IHEM 3787), els quals es trobaven filogenèticament més distanciats de la resta, van mostrar un tipus diferent de conidis, obovats, allargats o irregulars (Fig. 2C). Els aïllats del *clade* IV produïen conidis sèssils subglobosos, obovats o el·lipsoidals (Fig. 2E). Ni els aïllats del *clade* V ni els dos aïllats del *clade* IIa produïen conidis sèssils pigmentats. Les diferències entre aquests conidis relacionat amb les diferències observades en les taxes de creixement i en l'assimilació dels carbohidrats mencionats anteriorment (Taules 2 i 3) confirmen que els *clades* I, III, IV i V representen espècies diferents d'*S. schenckii*, els tres primers *clades* es proposen com a noves espècies i el *clade* V correspon a *S. albicans*.

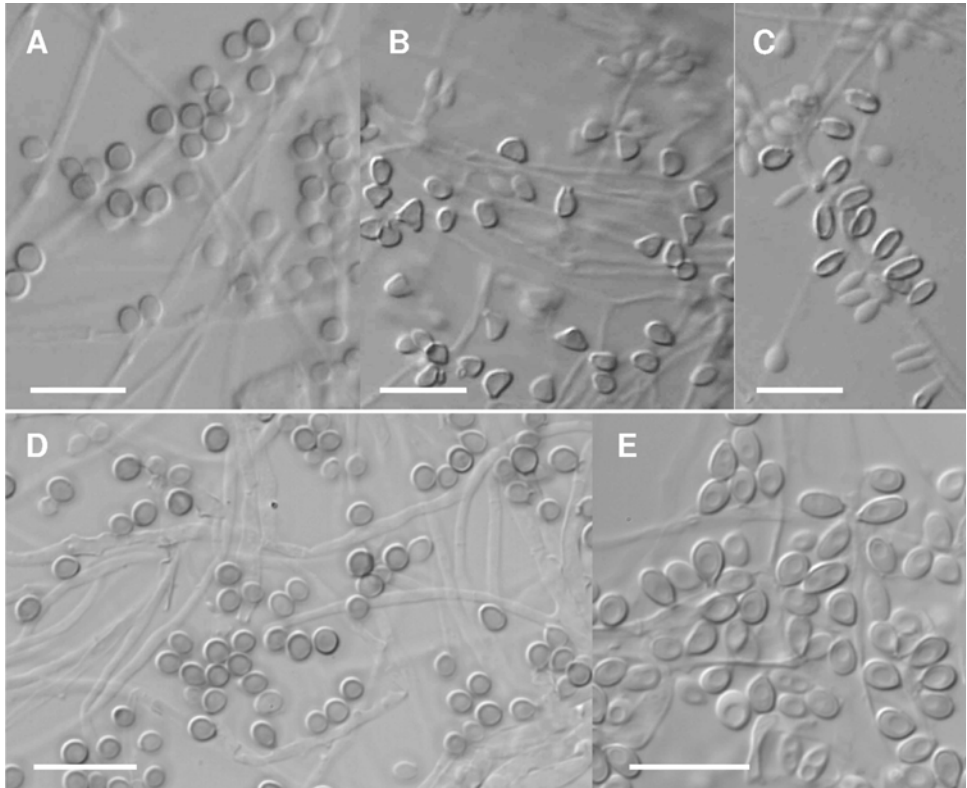


Fig. 2. Morfologia dels conidis sèssils de les espècies del complex d' *Sporothrix schenckii* (A) *Sporothrix brasiliensis*, CBS 120339 (clade I). (B i C) *Sporothrix schenckii* (clade II), (B) FMR 8608 (clade IIa) i (C) FMR 8677 (clade IIb). (D) *Sporothrix globosa*, CBS 120340 (clade III). (E) *Sporothrix mexicana*, CBS 120341 (clade IV). Barres = 10μm.

Sporothrix brasiliensis Marimon, Gené, Cano et Guarro, sp. nov. = *Sporothrix schenckii*, clade I sensu Marimon et al., J. Clin. Microbiol. 44(9):3251-3256, 2006

Coloniae in PDA ad 30°C post 21 dies 15 vel 38 mm diam. Augmentum fit in temperatura 37°C. Conidia sympodialia hyalina vel subhyalina, obovoidea,

2-6 x 1-4 µm. Conidia sessilis brunnea vel atrobrunnea, crassitunicata, plerumque globosa vel subglobosa, 2.5-5 x 2-3 µm. Teleomorphosis ignota. Assimilantur ribitolum variabile. Non assimilantur sucrosum et raffinsum.

Les colònies en PDA als 21 dies d'incubació a 30°C tenien un diàmetre 15 a 38 mm. Les cèl·lules conidiògenes majoritàriament eren terminals o intercalades en conidiòfors més o menys diferenciats, lleugerament inflades, i produïen conidis simpodials sobre pocs denticles. Els conidis simpodials eren normalment hialins o subhialins, obovats i de 2 a 6 µm de llarg per 1 a 4 µm d'ample. Els conidis sèssils eren de color marró a marró fosc, de paret gruixuda, globosos o subglobosos, i de 2.5 a 5 µm de llarg per 2 a 3 µm d'ample. Cap aïllat va desenvolupar el teleomorf. La temperatura màxima de creixement va ser 37°C (5 a 10 mm de diàmetre als 21 dies). Aquest fong no podia créixer a 40°C i va ser incapaç d'assimilar la sacarosa i la rafinosa. Es van observar resultats variables per l'assimilació del ribitol (pel 81.5% dels aïllats va ser negatiu). L'holotip és IMI 394469, de Rio de Janeiro, Brasil. S'ha dipositat la soca tipus al CBS 120339, FMR 8309, i IPEC 16490. L'etimologia fa referència al país d'origen dels aïllats.

Sporothrix globosa Marimon, Gené, Cano et Guarro, sp. nov. = *Sporothrix schenckii*, clade III sensu Marimon et al., J. Clin. Microbiol. 44(9):3251-3256, 2006.

Coloniae in PDA ad 30°C post 21dies 18 vel 40 mm diam. Augmentum fit in temperatura 35°C. Conidia sympodialia hyalina vel subhyalina, obovoidea, 2.5-5 x 1-3 µm. Conidia sessilis brunnea vel atrobrunnea, crassitunicata, plerumque globosa vel subglobosa, 3-4 x 2-3.5 µm. Teleomorphosis ignota. Assimilantur sucrosum et ribitolum. Non assimilantur raffinsum.

Les colònies en PDA als 21 dies d'incubació a 30°C tenen un diàmetre 18 a 40 mm. Les cèl·lules conidiògenes majoritàriament eren terminals o intercalars en conidiòfors més o menys diferenciats, sovint eren inflades, i

produïen conidis simpodials sobre nombrosos denticles. Els conidis simpodials eren normalment hialins o subhialins, obovats i de 2 a 5 μm de llarg per 1 a 3 μm d'ample. Els conidis sèssils eren de color marró a marró fosc, de paret gruixuda, globosos o subglobosos, i de 2.5 a 4 μm de llarg per 2 a 3.5 μm d'ample. Cap aïllat va desenvolupar el teleomorf. La temperatura màxima de creixement va ser 35°C (2.5 a 20 mm de diàmetre als 21 dies). Tots els aïllats van ser incapaços de créixer a 37°C, amb excepció de quatre soques, les quals mostraven un creixement molt restringit (fins a 2mm de diàmetre als 21 dies). Aquest fong no podia créixer a 40°C i va ser incapaç d'assimilar la rafinosa. El ribitol es va assimilar pel 90.9% dels aïllats. L'holotip és IMI 394470, de Saragossa, Espanya. La soca tipus s'ha dipositat al CBS 120340 i FMR 8600. L'etimologia fa referència a la forma esfèrica dels conidis laterals.

Sporothrix mexicana Marimon, Gené, Cano et Guarro, sp. nov. = *Sporothrix schenckii*, clade IV del present estudi. *Coloniae in PDA ad 30°C post 21dies 66 vel 69 mm diam. Augmentum fit in temperatura 37°C. Conidia sympodialia hyalina vel subhyalina, obovoidea, 3-5.5 x 2-2.5 μm . Conidia sessilis brunnea vel atrobrunnea, crassitunicata, subglobosa, obovoides vel ellipsoidea, 3-4 x 2-3.5 μm . Teleomorphosis ignota. Assimilantur ribitolum, sucrosum et raffinsum.*

Les colònies en PDA als 21 dies d'incubació a 30°C tenen un diàmetre 66 a 69 mm. Les cèl·lules conidiògenes majoritàriament eren terminals o intercalades en conidiòfors més o menys diferenciats, sovint eren inflades, i densament denticulades. Els conidis simpodials eren normalment hialins o subhialins, obovats i de 3 a 5.5 μm de llarg per 2 a 2.5 μm d'ample. Els conidis sèssils eren de color marró a marró fosc, de paret gruixuda, predominantment subglobosos, obovats o elipsoidals i de 3 a 4 μm de llarg per 2 a 3.5 μm d'ample. Cap aïllat va desenvolupar el teleomorf. La temperatura màxima de creixement va ser 37°C (1.5 a 2.5 mm de diàmetre

als 21 dies). Aquest fong no podia créixer a 40°C i va ser capaç d'assimilar la sacarosa, la rafinosa i el ribitol. L'holotip és IMI 394471, de Puebla, Mèxic. La soca tipus s'ha dipositat al CBS 120341 i FMR 9108. L'etimologia fa referència al país d'origen dels aïllats.

Discussió

Fins ara la esporotricosis, que és la infecció subcutània més comú de Sud Amèrica, s'ha atribuït a una sola espècie, *S. schenckii*, no obstant, un estudi molecular recent va demostrar que *S. schenckii* era possiblement un complex de sis espècies putatives (20), de fet, aquesta situació ja s'ha descrit per altres fongs patògens, on utilitzant diferents marcadors moleculars s'ha demostrat que genèticament són més complexes del que es pensava. Aquests és el cas de *Pneumocystis carinii* (1), *Coccidioides immitis* (17), *Aspergillus fumigatus* (26), *Candida parapsilosis* (29) o *Pseudallescheria boydii* (10) entre altres. Aquests estudis han demostrat que aquestes espècies són un complex de diferents espècies, sovint difícils de diferenciar fenotípicament, però amb característiques clíniques diferents i diferents llocs d'infecció o fins i tot diferents hostes.

El resultat més interessant i útil de la present tesi ha sigut trobar una clara correlació entre les dades moleculars i les característiques fenotípiques, la qual cosa ens ha permès diferenciar tres espècies noves d'*Sporothrix* dos de les quals estan associades a infeccions humanes (*S. brasiliensis* i *S. globosa*). Un altre aspecte interessant d'aquest estudi va ser el confirmar que el gen de la calmodulina és un bon marcador pel reconeixement d'aquestes espècies. Així seqüenciant només aquest locus i incloent més aïllats addicionals a l'anàlisi, vam ser capaços d'obtenir el mateixos grups que en l'estudi previ, on vam seqüenciar tres loci diferents (20), A més, l'anàlisi de les seqüències del gen de la CAL ens va ser útil per

demostrar que *S. albicans*, *S. inflata* i *S. schenckii* var. *luriei* eren espècies clarament diferents d'*S. schenckii*.

Per tal de confirmar que les noves espècies descrites eren exclusives, i sabent que diversos ascomicets pertanyents principalment al gènere *Ophiostoma*, poden formar anamorfs d'*Sporothrix*, i ja que hi ha seqüències de diversos d'aquests ascomicets dipositades a la base de dades del GenBank, vam seqüenciar un aïllat representatiu de cada una de les noves espècies (*S. brasiliensis* AM116946, *S. globosa* AF116966 i *S. mexicana* AM498344) per poder comparar. En tots els casos, el grau d'homologia amb les seqüències dipositades va ser molt baix.

El nostre estudi, en certa manera, ha confirmat estudis moleculars previs realitzats per altres autors, els quals ja havien demostrat una elevada variabilitat genètica en *S. schenckii* (13, 14, 15, 22, 32). Watanabe et al. (32) va testar 204 aïllats utilitzant anàlisis per RFLP de la regió ITS, i agrupava els aïllats en 4 tipus, que relaciona amb els orígens geogràfics. El tipus I era predominant d'Àfrica i Amèrica, el tipus II a Sud Amèrica, el tipus III es va trobar predominantment a Nord Amèrica i el tipus IV a Austràlia i Àsia. Aquesta distribució geogràfica és similar a l'obtinguda en el nostre treball, no obstant, en el nostre cas les soques d'Àsia s'agrupaven amb les europees formant un grup altament suportat, el qual és la base de la nova espècie proposada *S. globosa*. Aquest fet coincideix amb l'estudi de Ishizaki et al. (14), en que analitzaven l'ADN mitocondrial per RFLP, on els aïllats europeus (tots d'Espanya) s'agrupaven en el mateix grup filogenètic que incloïa aïllats de Corea, Xina i Japó. Al *clade* d'*S. globosa*, es van incloure 5 soques clíniques d'origen ambiental, les quals havien sigut prèviament identificades com a aïllats d'*S. schenckii* per anàlisi de RFLP de l'ADN mitocondrial per Ishizaki et al. (15). Aquests aïllats mostraven les mateixes característiques fenotípiques que la resta dels aïllats del *clade*. Amb excepció de les soques del Brasil, i de tres soques dels Estats Units, la resta d'aïllats d'Amèrica estaven inclosos en el *clade* II, com en el nostre estudi

previ (20). Aquest *clade* era el grup més heterogeni genèticament, i probablement inclou més espècies filogenètiques, no obstant no vam trobar suficients característiques fenotípiques per distingir-les. Dins d'aquest *clade* s'hi trobava inclosa la soca tipus de *S. schenckii* també d'origen americà.

La forma sapròfita d'*S. schenckii* es caracteritza per dos tipus de conidis (5, 19) descrits anteriorment, els laterals i els simpodials. Mentre la mida i la forma dels laterals és molt variable (globosa, subglobosa, elipsoidal, triangular, etc...) entre els aïllats, la morfologia dels conidis simpodials és més constant, sent en general més o menys ovoides. Examinant la morfologia dels conidis laterals vam trobar diferències significatives entre els *clades*, les quals combinades amb les dades fisiològiques ens van permetre la diferenciació d'algunes de les espècies críptiques dins del grup de soques que vam rebre identificades com a *S. schenckii*. Altres autors, han relacionat també la morfologia dels conidis laterals amb algunes característiques fisiològiques, en aïllats ambientals d'*S. schenckii*. Per exemple, soques ambientals aïllades per Mackinnon (18), de diferents zones, mostraven conidis ovals pigmentats i múltiples espícules a la hifa després de que es desenganxés el conidi. Aquests aïllats creixien a 37°C i eren patògens pels ratolins. Al contrari d'altres soques ambientals aïllades per Howard i Orr (12) formaven conidis esfèrics pigmentats, que difícilment es desenganxaven de la hifa. Aquests aïllats no creixien a 37°C i no eren patògens pels ratolins. Mesa-Arango *et al.* (22) van trobar diferències significatives en la mida dels conidis entre els grups generats per l'anàlisi de l'ADN per RAPD, els quals coincideixen amb diferents localitzacions geogràfiques. No obstant, aquests no van indicar a quin tipus de conidi es referien i una cosa important a tenir en compte és que, en general, la esporulació d'*Sporothrix* spp., especialment en la producció dels conidis laterals, pot variar considerablement utilitzant el medi de cultiu de rutina com l'agar Sabouraud o el PDA. Nosaltres recomanem, l'ús del CMA per determinar l'estructura microscòpica d'aquest fong, ja que així la morfologia es manté estable. Ens va sorprendre el fet que la soca tipus d'*S. schenckii*

(CBS 359.36) només produïa conidis simpodials hialins. Aquesta soca s'havia descrit amb la presència de conidis pigmentats (11), no obstant vam ser incapaços d'observar cap conidi pigmentat sèssil, i suposem que la soca ha degenerat perdent l'habilitat de produir aquests tipus de conidis. La soca NBRC 8158, morfològicament i genèticament idèntica a la soca tipus, i d'origen desconegut, deu ser probablement un subcultiu de la soca tipus.

Hi ha molts pocs estudis fisiològics realitzats amb *S. schenckii*. Gosh *et al.* (9) va testar 49 aïllats de la Índia, i cap d'ells va tolerar una concentració de NaCl del 10%, en canvi, aproximadament la meitat dels aïllats del nostre estudi van tolerar aquesta concentració, malgrat que els aïllats d'*S. brasiliensis* van mostrar el creixement més restringit en aquestes condicions. També vam trobar importants discrepàncies amb els resultats de Ghosh *et al.* (9) referent a l'assimilació d'alguns carbohidrats com l'inositol i el manitol. Aquestes dos proves van ser negatives per tots els aïllats testats prèviament per Ghosh *et al.* (9), mentre que en el nostre estudi eren positives. Els resultats dels estudis d'assimilació de la cel·lobiosa, el ribitol, la D-galactosa, la D-glucosa, el glicerol, la maltosa, el sorbitol, la trealosa i la D-xilosa van ser similars als dos estudis. Ghosh *et al.* (9) van trobar resultats variables en l'assimilació de la rafinosa, la ramnosa i la dextrina entre les diferents àrees geogràfiques estudiades. Nosaltres també vam trobar resultats variables per la rafinosa; no obstant, tots els nostres aïllats van ser capaços d'assimilar la ramnosa i la dextrina. Una explicació per aquestes discrepàncies entre els dos estudis podria recaure en el fet de que Ghosh *et al.* (9) utilitzaven un mètode auxanogràfic, en medi sòlid amb discs impregnats amb solucions saturades dels carbohidrats incubat a 37°C, mentre que nosaltres utilitzàvem medi líquid incorporat a microplaques incubat a 25°C.

Malgrat que vam avaluar la resposta de més de 40 proves fisiològiques, només ens van ser útils per a la discriminació de les espècies del complex de *S. schenckii* l'assimilació de la sacarosa, la rafinosa i el ribitol. Els nostres

resultats coincideixen amb els de Dixon *et al.* (8) en la capacitat de les soques ambientals de créixer a 35°C. No obstant el creixement de tots els aïllats clínics a 37°C no suporta els nostres resultats per a *S. globosa*, que no va créixer a aquesta temperatura.

En conclusió, *S. schenckii* no s’ha de considerar com una sola espècie. Utilitzant els procediments descrits aquí, i les dades resumides a la taula 4, les diferents espècies del complex, poden ser fàcilment i fiablement identificades, sense la necessitat de tècniques moleculars. Com més informació epidemiològica es trobi disponible per aquestes espècies, millor podrem entendre la seva distribució geogràfica, el seu paper en les malalties i la seva potencial diferència en la resposta als agents antifúngics.

Taula 4. Resum de les característiques claus per a la diferenciació de les espècies del complex d’*S. schenckii*

Espècies	Presència de conidis sèssils pigmentats	Colònies en PDA a 30°C excedeixen 50 mm en 21 dies	Creixement a 37°C	Tests d’assimilació	
				Sacarosa	Rafinosa
<i>S. albicans</i>	No	Sí	Sí	+	-
<i>S. brasiliensis</i>	Sí	No	Sí	-	-
<i>S. globosa</i>	Sí	No	No	+	-
<i>S. mexicana</i>	Sí	Sí	Sí	+	+
<i>S. schenckii</i>	Sí	No	Sí	+	+

Agraïments

Els autors agraeixen als directors del Centraalbureau voor Schimmelcultures (Utrecht, Holanda), BCCM™/IHEM Biomedical Fungi and Yeasts Collection (Brussel·les, Bèlgica), A. Espinosa (Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Universidad Autónoma de

Puebla, Mèxic), J. M. Torres (IMIM, Hospital del Mar, Barcelona, Espanya), C. Rubio (Hospital Universitario Lozano Blesa, Zaragoza, Espanya), R. Negroni (Hospital de Infecciosas Francisco Javier Muñiz, Buenos Aires, Argentina), L. Trilles (Serviço de Micologia Médica, Instituto Evandro Chagas, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil), P. Godoy (Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, Brasil), M. Paniso (Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel", Caracas, Veneçuela), C. Hartung (Instituto de Medicina Tropical, Caracas, Veneçuela) i a A. Chakrabarti (Center for Advance Research In Medical Mycology, Chandigarh, Índia) per facilitar-nos la majoria de les soques utilitzades en aquest estudi. Aquest treball ha estat finançat pel Ministerio de Ciencia y Tecnología espanyol, concessió CGL 2005-07394.

Referències

1. **Beard, C. B., J. L. Carter, S. P. Keely, L. Huang, N. J. Pieniazek, I. N. Moura, J. M. Roberts, A. W. Hightower, M. S. Bens, A. R. Freeman, S. Lee, J. R. Stringer, J. S. Duchin, C. del Rio, D. Rimland, R. P. Baughman, D. A. Levy, V. J. Dietz, P. Simon, and T. R. Navin.** 2000. Genetic variation in *Pneumocystis carinii* isolates from different geographic regions: implications for transmission. *Emerg. Infect. Dis.* **6**:265–272.
2. **Berbee, M. L., and J. W. Taylor.** 1992. 18S ribosomal RNA gene sequence characters place the human pathogen *Sporothrix schenckii* in the genus *Ophiostoma*. *Exp. Mycol.* **16**:87–91.
3. **da Rosa, A. C., M. L. Scroferneker, R. Vettorato, R. L. Gervini, G. Vettorato, and A. Weber.** 2005. Epidemiology of sporotrichosis: a study of 304 cases in Brazil. *J. Am. Acad. Dermatol.* **52**:451–459.

4. **de Beer, Z. W., T. C. Harrington, H. F. Vismer, B. D. Wingfield, and M. J. Wingfield.** 2003. Phylogeny of the *Ophiostoma stenoceras-Sporothrix schenckii* complex. *Mycologia* **95**:434–441.
5. **de Hoog, G. S.** 1974. The genera *Blastobotrys*, *Sporothrix*, *Calcarisporium* and *Calcarisporiella* gen. nov. *Stud. Mycol.* **7**:1–84.
6. **de Hoog, G. S., J. Guarro, J. Gené, i M. J. Figueras.** 2000. Atlas of clinical fungi, 2nd ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands.
7. **de Hoog, G. S., F. D. Marvin-Sikkema, G. A. Lahpoor, J. C. Gottschall, R. A. Prins, i E. Guého.** 1994. Ecology and physiology of the emerging opportunistic fungi *Pseudallescheria boydii* and *Scedosporium prolificans*. *Mycoses* **37**:71–78.
8. **Dixon, D. M., I. F. Salkin, R. A. Duncan, N. J. Hurd, J. H. Haines, M. E. Kemna, i F. B. Coles.** 1991. Isolation and characterization of *Sporothrix schenckii* from clinical and environmental sources associated with the largest U.S. epidemic of sporotrichosis. *J. Clin. Microbiol.* **29**:1106–1113.
9. **Ghosh, A., P. K. Maity, B. M. Hemashettar, V. K. Sharma, i A. Chakrabarti.** 2002. Physiological characters of *Sporothrix schenckii* isolates. *Mycoses* **45**:449–454.
10. **Gilgado, F., J. Cano, J. Gené, i J. Guarro.** 2005. Molecular phylogeny of the *Pseudallescheria boydii* species complex: proposal of two new species. *J. Clin. Microbiol.* **43**:4930–4942.

11. **Hektoen, L., i C. F. Perkins.** 1900. Refractory subcutaneous abscesses caused by *Sporothrix schenckii*. A new pathogenic fungus. J. Exp. Med. **5**:77-89.
12. **Howard, D. H., i G. F. Orr.** 1963. Comparison of strains of *Sporotrichum schenckii* isolated from nature. J. Bacteriol. **85**:816-821.
13. **Ishizaki, H., M. Kawasaki, M. Aoki, T. Matsumoto, A. A. Padhye, M. Mendoza, i R. Negroni.** 1998. Mitochondrial DNA analysis of *Sporothrix schenckii* in North and South America. Mycopathologia **142**:115-118.
14. **Ishizaki, H., M. Kawasaki, M. Aoki, S. Wu, J. Lin, J. A. Kim, Y. H. Won, i C. R. Calvo.** 2004. Mitochondrial DNA analysis of *Sporothrix schenckii* from China, Korea and Spain. Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi **45**:23-25.
15. **Ishizaki, H., M. Kawasaki, M. T. Mochizuki, X. Z. Jin, i S. Kagawa.** 2002. Environmental isolates of *Sporothrix schenckii* in China. Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi **43**:257-260.
16. **Johnson, E. M., A. Szekely, i D. W. Warnock.** 1998. In-vitro activity of voriconazole, itraconazole and amphotericin B against filamentous fungi. J. Antimicrob. Chemother. **42**:741-745.
17. **Koufopanou, V., A. Burt, T. Szaro, i J. W. Taylor.** 2001. Gene genealogies, cryptic species and molecular evolution in the human pathogen *Coccidioides immitis* and relatives (Ascomycota, Onygenales). Mol. Biol. Evol. **18**:1246-1258.

18. **Mackinnon, J. E.** 1970. Ecology and epidemiology of sporotrichosis, p. 169–181. *In* Proceedings of the International Symposium on Mycoses. Pan American Health Organization, Washington, DC.
19. **Mariat, F., P. Laval, i P. Destombes.** 1962. Recherches sur la Sporotrichose. Etude mycologique et pouvoir pathogene de souches Mexicaines de *Sporothrix schenckii*. *Sabouraudia* **2**:60–79.
20. **Marimon, R., J. Gené, J. Cano, L. Trilles, M. Dos Santos Lazera, i J. Guarro.** 2006. Molecular phylogeny of *Sporothrix schenckii*. *J. Clin. Microbiol.* **44**:3251–3256.
21. **McGinnis, M. R., N. Nordoff, R. K. Li, L. Pasarelli, i D. W. Warnock.** 2001. *Sporothrix schenckii* sensitivity to voriconazole, itraconazole and amphotericin B. *Med. Mycol.* **39**:369–371.
22. **Mesa-Arango, A. C., M. R. Reyes-Montes, A. Pérez-Mejía, H. Navarro-Barranco, V. Souza, G. Zúñiga, i C. Toriello.** 2002. Phenotyping and genotyping of *Sporothrix schenckii* isolates according to geographic origin and clinical form of sporotrichosis. *J. Clin. Microbiol.* **40**:3004–3011.
23. **Neyra, E., P. Fonteyne, D. Swinne, F. Fauche, B. Bustamante, i N. Nolard.** 2005. Epidemiology of human sporotrichosis investigated by amplified fragment length polymorphism. *J. Clin. Microbiol.* **43**:1348–1352.
24. **O'Donnell, K.** 2000. Molecular phylogeny of the *Nectria haematococca-Fusarium solani* species complex. *Mycologia* **92**:919–938.

25. **O'Reilly, L. C., i S. A. Altman.** 2006. Macrorestriction analysis of clinical and environmental isolates of *Sporothrix schenckii*. J. Clin. Microbiol. **44**: 2547–2552.

26. **Pringle, A., D. M. Baker, J. L. Platt, J. P. Wares, J. P. Latge, i J. W. Taylor.** 2005. Cryptic speciation in the cosmopolitan and clonal human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. Evolution **59**:1886–1899.

27. **Suzuki, K., M. Kawasaki, i H. Ishizaki.** 1988. Analysis of restriction profiles of mitochondrial DNA from *Sporothrix schenckii* and related fungi. Mycopathologia **103**:147–151.

28. **Swofford, D. L.** 2001. PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods) (version 4.0). Sinauer Associates, Sunderland, MA.

29. **Tavanti, A., A. D. Davidson, N. A. R. Gow, i M. C. J. Maiden.** 2005. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. J. Clin. Microbiol. **43**:284–292.

30. **Travassos, L. R., i K. O. Lloyd.** 1980. *Sporothrix schenckii* and related species of *Ceratocystis*. Microbiol. Rev. **44**:683–721.

31. **Trilles, L., B. Fernández-Torres, M. Dos Santos Lazera, B. Wanke, A. De Oliveira Schubach, R. de Almeida Paes, I. Inza, i J. Guarro.** 2005. In vitro antifungal susceptibilities of *Sporothrix schenckii* in two growth phases. Antimicrob. Agents Chemother. **49**:3952–3954.

32. **Watanabe, S., M. Kawasaki, T. Mochizuki, i H. Ishizaki.** 2004. RFLP analysis of the internal transcriber spacer regions of *Sporothrix schenckii*. Jpn. J. Med. Mycol. **45**:165–175.

33. **Yarrow, D.** 1998. Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts, p. 95–96. *In* C. P. Kurtzman, and J. W. Fell (ed.), The yeasts, a taxonomic study, 4th ed. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
34. **Zhang, Z., X. Liu, G. Yang, X. Gao, L. Jin, i L. An.** 2006. Genotyping of *Sporothrix schenckii* by analysis of ribosomal DNA regions. *Mycoses* **49**:305–310

4.3 Sensibilitat antifúngica *in vitro* a 5 espècies d'*Sporothrix*

Aquest estudi ha estat enviat a l'*Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (veure Annex 4) amb el format de nota curta que es mostra a continuació.

Resum

Noranta-dos aïllats de 5 espècies del complex d'*Sporothrix schenckii* es van testar en un assaig *in vitro* amb dotze antifúngics, utilitzant el mètode de referència de microdilució. Es van trobar diferències significatives entre les espècies estudiades, sent *Sporothrix brasiliensis* l'espècie amb els valors de CMI's més baixos i *Sporothrix mexicana* la que va presentar els valors més elevats. En general la terbinafina va ser l'antifúngic més actiu, seguit pel ketoconazol i el posaconazol.

L'esporotricosi és una infecció subaguda o crònica causada pel fong dimòrfic *Sporothrix schenckii*, que afecta tant a homes com a animals. Aquesta malaltia es caracteritza pel desenvolupament de lesions nodulars cutànies i subcutànies, principalment a extremitats i que poden involucrar al sistema limfàtic adjacent (2,18). La solució saturada de iodur de potassi s'ha utilitzat com a teràpia efectiva per a les esporotricosis limfocutànies. Altres fàrmacs comunament utilitzats són l'itraconazol (ITC) per al tractament de les infeccions limfocutànies (1, 11, 20), i l'amfotericina B (AMB) per les infeccions severes o per quan la teràpia amb ITC falla (9). Malgrat tots aquests fàrmacs són generalment efectius, la llarga duració dels tractaments i la toxicitat de l'AMB fan necessari explorar noves alternatives pel tractament de les infeccions més severes.

Alguns estudis *in vitro* han mostrat resultats variables entre soques testades, i alguns autors han indicat que la sensibilitat als antifúngics depèn de cada soca (7, 14, 21). Això es podria explicar pel fet de que *S. schenckii* no està representat per una sola espècie, sino que és un complex d'espècies críptiques. Recentment utilitzant una anàlisi de seqüenciació multilocus, vam poder demostrar que hi ha almenys 6 espècies filogenètiques diferents dins el complex (13), estant algunes d'aquestes espècies caracteritzades fenotípicament (12). Degut a que la sensibilitat als antifúngics d'aquestes espècies és desconeguda, hem avaluat l'activitat *in vitro* de 12 antifúngics enfront la fase miceliar de 92 aïllats representatius de les cinc espècies del complex (Taula 1), utilitzant el mètode de referència de microdil·lució (15). Els aïllats es van seleccionar intentant que compreguessin un ampli rang d'orígens geogràfics,

Els 92 aïllats aïllats utilitzats en l'estudi es trobaven conservats en tubs d'agar dextrosa patata (PDA; Difco Laboratories, Detroit, Mich.) coberts amb oli de parafina; es van subcultivar en el mateix medi de cultiu i es van incubar a 30°C durant 5-6 dies. Com a soques control es van utilitzar *Candida krusei* ATCC 6258 i *C. parapsilosis* ATCC 22019. Els agents antifúngics es van obtenir com a pols pura. L'AMB (USP, Rockville, MD), l'ITC, el ketoconazol (KTC) (Janssen Pharmaceutica, Beerse, Belgium), l'albaconazol (ABC) (J. Uriach & Cía, Barcelona, Espanya), el voriconazol (VRC) (Pfizer Inc., NY, EUA), el posaconazol (PSC) (Schering-Plough, Kenilworth, EUA), el ravuconazol (RVC) (Bristol-Myers Squibb Company, New Brunswick, NJ), l'eberconazol (EBC) (Laboratorios Salvat, S. A., Barcelona, Espanya) i la terbinafina (TBF) (Novartis, Basel, Suïssa) es van diluir en dimetil sulfoxi (Panreac Química S.A., Barcelona, espanya), i la micafungina (MFG) (Astellas Pharma Inc., Tokyo, Japó), la flucitosina (5FC) (Sigma-Aldrich corp., St. Louis, EUA.) i el fluconazol (FLC) (Pfizer Inc., Madrid, Espanya) en aigua destil·lada estèril.

Les microplaques es van preparar tal i com es descriu en el document M38A (15). Les concentracions finals dels antifúngics van ser d'uns rangs de

128 a 0.25 µg/ml per la MFG, de 64 a 0.12 µg/ml per el FLC i la 5FC, i de 16 a 0.03 µg/ml per la resta de compostos. L'inòcul es va obtenir seguint les recomanacions del CLSI. Els inòculs es van ajustar a una densitat òptica entre 0.09 i 0.11, la qual correspon a un inòcul final de 1.0×10^4 a 5.0×10^4 UFC/ml. Les microplaques es van incubar a 30°C i es van llegir a les 72h. El punt de lectura de la CMI dels triazols, l'AMB i la MFG es va definir com la concentració mínima a la que produeix una completa inhibició del creixement fúngic i per el FLC, el KTC i la 5FC com la concentració mínima necessària per produir el 50% d'inhibició del creixement fúngic. Aproximadament el 80% de les proves es van repetir, i en general van mostrar la mateixa tendència (resultats no mostrats), només aquells resultats que van ser diferents es van repetir i el valor més comú va ser l'escollit.

Els resultats es mostren a la Taula 1. Les CMIs obtingudes per les soques control es van trobar dins els rangs establerts. La TBF va ser el fàrmac més actiu amb una mitja geomètrica (MG) de les CMIs de 0.23 µg/ml per tots els aïllats testats, seguit per el KTC amb una MG de les CMIs de 0.84 µg/ml. No obstant, aquest últim antifúngic, va ser significativament menys actiu enfront de *S. mexicana* (MG CMI de 4 µg/ml) i *S. albicans* (MG CMI de 3.2 µg/ml) que enfront de les altres espècies del complex ($P < 0.05$). L'activitat del KTC va ser més variable que la de la TBF i depenent de l'espècie testada. El PSC va ser el tercer antifúngic testat més actiu amb una MG CMI de 1.59 µg/ml i el més actiu dels antifúngics d'ús sistèmic. Malgrat només vam poder testar dos aïllats d'*S. mexicana*, aquesta va ser l'espècie amb els valors més elevats de CMIs, i només la TBF va mostrar CMIs relativament baixes (0.5 µg/ml) enfront d'aquesta espècie. El FLC i la MFG no van mostrar activitat enfront de cap dels aïllats testats, tal i com ja s'havien estat demostrat prèviament per altres autors (21, 11). El VRC va mostrar poca activitat, en concordança amb McGinnis *et al.* (14), qui va obtenir una MG de la CMI elevada (6.5 µg/ml) enfront també de soques d'*S. schenckii*.

El RVC i l'ITC només van mostrar bona activitat enfront d'*S. brasiliensis* ($p < 0.01$ vers les altres espècies), mentre que per les altres espècies testades aquests dos fàrmacs van mostrar alts valors de CMI. Altres autors (14) també han demostrat la poca activitat *in vitro* de l'ITC, però malgrat aquests mals resultats *in vitro*, l'ITC generalment mostra una bona eficàcia en el seu ús clínic. Conti Diaz *et al.* (1) van tractar exitosament amb aquest fàrmac 18 pacients amb esporotricosi cutània. Sharkey-Mathis *et al.* (20) van reportar que 11 de 15 pacients (83%) amb esporotricosi osteoarticular van respondre satisfactòriament a la teràpia amb ITC.

En el present treball, la TBF ha mostrat una elevada activitat enfront de totes les espècies testades. No obstant, el potencial terapèutic de la TBF només s'ha confirmat per casos d'esporotricosi cutània o limfocutània (5,6,17,19). En canvi, aquest fàrmac no ha demostrat eficàcia en el tractament d'esporotricosi sistèmica en un model murí (8). En les infeccions severes o sistèmiques, el PSC és un agent terapèutic prometedor ja que *in vitro* ha funcionat millor que l'AMB i l'ITC, almenys enfront d'*S. brasiliensis*, *S. albicans* i *S. schenckii*. Són necessaris més estudis *in vivo* per tal de confirmar aquesta activitat. Encara que els resultats *in vitro* no sempre es relacionen amb el que succeeix *in vivo*, cap dels antifúngics testats va mostrar activitat enfront d'*S. mexicana* i *S. globosa*. Seria interessant conèixer si alguna combinació de fàrmacs exerceix alguna activitat enfront d'alguna d'aquestes espècies. No obstant, no hi ha dades disponibles de l'activitat de la combinació d'antifúngics enfront d'*S. schenckii sensu lato*.

En aquests últims anys, l'aplicació del concepte d'espècie filogenètica en diferents espècies biològiques de fongs patògens ha revelat diferents llinatges que han reflectit la divergència d'espècies (3, 10, 16). La definició d'aquests grups filogenètics i el desenvolupament de mètodes senzills per la seva identificació és crucial, ja que poden mostrar comportaments patogènics diferents i diferent resposta als agents antifúngics (4). Aquest estudi ha demostrat que *S. schenckii* constitueix un clar exemple d'aquest últim fet.

Taula 1. Activitat antifúngica enfront a 92 aïllats del complex d'espècies d'S. schenckii.

Fongs (nº aïllats testats)	CMI (µg/ml)	AMB	FLC	ITC	VRC	RVC	PSC	ABC	EBC	MFG	TBF	KTC	5FC
S. brasiliensis (23)	Rang	1-4	128	0.5-2	0.5-16	0.06-2	0.25-1	0.25-4	0.06-1	256	0.06-0.25	0.06-0.5	2-128
	GM ^a	1.67	128	0.7	3.88	0.44	0.62	1.13	0.26	256	0.09	0.15	14.49
	50% ^b	2	128	0.5	4	0.5	0.5	1	0.25	256	0.06	0.125	16
	90% ^c	4	128	1	8	1	1	4	1	256	0.25	0.25	128
S. schenckii (34)	Rang	0.5-4	128	1-32	2-32	0.5-32	0.5-16	1-32	0.25-8	256	0.06-0.5	0.125-4	4-128
	GM	2.57	128	4	17.4	6.63	1.75	13.3	1.87	256	0.22	1	15.3
	50%	4	128	4	32	8	1	16	2	256	0.25	1	16
	90%	4	128	32	32	16	8	32	8	256	0.5	2	128
S. globosa (17)	Rang	2-8	128	1-32	16-32	2-16	1-16	2-16	0.5-4	256	0.06-1	0.25-2	16-128
	GM	4.2	128	8.33	27.2	8	3.13	11.02	2.26	256	0.25	1.04	51.53
	50%	4	128	32	32	8	2	16	2	256	0.25	1	64
	90%	8	128	32	32	16	8	16	4	256	0.5	2	128
S. mexicana (2)	Rang	16-32	128	32	16-32	32	32	32	32	256	0.5	4	128
	GM	20.16	128	32	32	32	32	32	32	256	0.5	4	128
S. albicans (16)	Rang	2-8	128	32	4-32	8-32	1-2	8-32	2-16	256	0.25-4	2-8	128
	GM	5.18	128	32	11.8	19.03	1.91	18.38	9.51	256	0.8	3.2	128
	50%	4	128	32	8	16	2	16	8	256	0.5	4	128
	90%	8	128	32	32	32	2	32	16	256	4	4	128
Total (92)	Rang	0.5-32	128	0.5-32	0.5-32	0.06-32	0.25-16	0.25-32	0.06-32	256	0.06-4	0.06-8	1-128
	GM	3.1	128	4.65	13.2	4.6	1.59	7.58	1.84	256	0.23	0.84	30.48
	50%	4	128	2	16	8	1	16	2	256	0.25	1	32
	90%	8	128	32	32	16	8	32	16	256	0.5	4	128

^a GM, mitjana geomètrica; ^b 50%, CMI a la qual el 50% dels aïllats han inhibit el seu creixement; ^c 90%, CMI a la qual el 90% dels aïllats han inhibit el seu creixement.

Concloent, aquest estudi ha demostrat que l'adequada identificació de les espècies del complex d'*S. schenckii* pot ser important per l'elecció del tractament apropiat. Per exemple, en el cas d'una infecció sistèmica, si l'espècie causant de la infecció fos *S. mexicana* és probable que la resposta al tractament amb ITC o PSC fos més pobre que si l'espècie infectant fos *S. brasiliensis*.

Agraïments

Els autors agraeixen als directors del Centraalbureau voor Schimmelcultures (Utrecht, Holanda), BCCM™/IHEM Biomedical Fungi and Yeasts Collection (Brussel·les, Bèlgica), A. Espinosa (Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Universidad Autónoma de Puebla, Mèxic), J. M. Torres (IMIM, Hospital del Mar, Barcelona, Espanya), C. Rubio (Hospital Universitario Lozano Blesa, Zaragoza, Espanya), R. Negróni (Hospital de Infecciosas Francisco Javier Muñiz, Buenos Aires, Argentina), L. Trilles (Serviço de Micologia Médica, Instituto Evandro Chagas, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil), P. Godoy (Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, Brasil), M. Kawasaki (Department of Dermatology, Kanazawa Medical University, Ishikawa, Japan) i D. A. Sutton (Department of Pathology, University of Texas Health Science Center, San Antonio, TX, EUA) per subministrar-nos la majoria de les soques utilitzades en aquest estudi. Aquest treball ha estat finançat pel Ministerio de Ciencia y Tecnología espanyol, concessió CGL 2005-07394.

Referències

1. **Conti Díaz, I. A., E. Civil, i E. Gezuele.** 1992. Treatment of human cutaneous sporotrichosis with itraconazole. *Mycoses* **35**:153-156.
2. **De Araujo, T., A. C. Marques, i F. Kerdell.** 2001. Sporotrichosis. *Int. J. Dermatol.* **40**:737-742.

3. **Gilgado, F., J. Cano, J. Gené, i J. Guarro.** 2005. Molecular phylogeny of the *Pseudallescheria boydii* species complex: proposal of two new species. J. Clin. Microbiol. **43**:4930-4942.
4. **Gilgado, F., C. Serena, J. Cano, J. Gene, i J. Guarro.** 2006. Antifungal susceptibilities of the species of the *Pseudallescheria boydii* complex. Antimicrob. Agents Chemother. **50**:4211-4213.
5. **Hay, R. J.** 1999. Therapeutic potential of terbinafine in subcutaneous and systemic mycoses. Br. J. Dermatol. **141**(Suppl. 56):36-40.
6. **Jessup, C. J., N. S. Ryder, i M. A. Ghannoum.** 2000. An evaluation of the *in vitro* activity of terbinafine. Med. Mycol. **38**:155-159.
7. **Johnson, E. M., A. Szekely, i D. W. Warnock.** 1998. In-vitro activity of voriconazole, itraconazole and amphotericin B against filamentous fungi. J. Antimicrob. Chemother. **42**:741-745.
8. **Kan, V. L., i J. E. Bennett.** 1988. Efficacies of four antifungal agents in experimental murine sporotrichosis. Antimicrob. Agents Chemother. **32**:1619-1623.
9. **Kauffman, C., R. Hajjeh, i W. Chapman.** 2000. Practice guidelines for the Management of Patients with Sporotrichosis Clin. Infect. Dis. **30**:684-687.
10. **Koufopanou, V., A. Burt, T. Szaro, i J. W. Taylor.** 2001. Gene genealogies, cryptic species, and molecular evolution in the human pathogen *Coccidioides immitis* and relatives (Ascomycota, Onygenales). Mol. Biol. Evol. **18**:1246-1258.

11. **Lortholary, O., D. W. Denning, i B. Dupont.** 1999. Endemic mycoses: a treatment update. *J. Antimicrob. Chemother.* **43**:321-331.
12. **Marimon, R., Cano, J., Gené, J., Sutton D. A., Kawasaki, M. i J. Guarro.** 2007. Three new *Sporothrix* species of clinical interest: *S. brasiliensis*, *S. globosa* and *S. mexicana*. *J. Clin. Microbiol.*, en premsa.
13. **Marimon, R., J. Gené, J. Cano, L. Trilles, M. Dos Santos Lazera, i J. Guarro.** 2006. Molecular phylogeny of *Sporothrix schenckii*. *J. Clin. Microbiol.* **44**:3251-3256.
14. **McGinnis, M. R., N. Nordoff, R. K. Li, L. Pasarell, i D. W. Warnock.** 2001. *Sporothrix schenckii* sensitivity to voriconazole, itraconazole and amphotericin B. *Med. Mycol.* **39**:369-371.
15. **National Committee for Clinical Laboratory Standards.** 2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard M38-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
16. **O'Donnell, K.** 2000. Molecular phylogeny of the *Nectria haematococca-Fusarium solani* species complex. *Mycologia* **92**:919-938.
17. **Pérez, A.** 1999. Terbinafine: broad new spectrum of indications in several subcutaneous and systemic and parasitic diseases. *Mycoses* **42**(Suppl. 2):111-114.
18. **Rippon, J. W.** 1988. Sporothrichosis, p 277-302. *In* J. W. Rippon (ed.), Medical mycology. The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes, 3rd ed. The W.B. Saunders Company, Philadelphia, Pa.

19. **Ryder, N. S.** 1999. Activity of terbinafine against serious fungal pathogens. *Mycoses* **42**(Suppl. 2):115-119.
20. **Sharkey-Mathis, P. K., C. A. Kauffman, J. R. Graybill, D. A. Stevens, T. S. Hostetler, G. Cloud, i W. E. Dismukes.** 1993. Treatment of sporotrichosis with itraconazole. *Am. J. Med.* **95**:279-285.
21. **Trilles L., B. Fernandez-Torres, M. Dos Santos Lazera, B. Wanke, A. de Oliveira Schubach, R. de Almeida Paes, I. Inza, i J. Guarro.** 2005. *In vitro* antifungal susceptibilities of *Sporothrix schenckii* in two growth phases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:3952-3954.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

FILOGÈNIA MOLECULAR I CARACTERITZACIÓ FENOTÍPICA DEL COMPLEX D'ESPÈCIES DE
SPOROTHRIX SCHENCKII

Rita Marimón Picó

ISBN: 978-84-691-1554-1 /DL:T.147-2008

4.4 *Sporothrix luriei*, un fong rar d'origen clínic.

Aquest estudi ha estat sotmès al Clinical Microbiology and Infection (veure Annex 5) amb el format de nota curta que es mostra a continuació.

Resum

***Sporothrix schenckii* var. *luriei* és un fong força rar el qual s'ha publicat en quatre ocasions en infeccions en humans, però que sols s'ha aïllat en una ocasió d'una pacient a Àfrica. En aquest estudi es proposa com a una espècie diferent d'*S. schenckii* en base a les característiques fenotípiques i a l'anàlisi multilocus de les seqüències dels gens de la quitina sintasa, la β -tubulina i la calmodulina.**

En els últims anys, s'han realitzat diversos estudis moleculars de nombrosos aïllats morfològicament identificats com a *S. schenckii* de diferents regions geogràfiques [1, 2, 3, 4]. Aquests estudis han demostrat un alt grau de variabilitat genètica en aquesta espècie, convertint a *S. schenckii* es un complex de nombroses espècies críptiques. Recentment, hem caracteritzat tres d'aquestes espècies utilitzant un estudi polifàsic [5]. Ajello i Kaplan [6] van descriure la varietat *S. schenckii* var. *luriei* d'una soca aïllada el 1956 d'un home de Sud Àfrica amb esporotricosi, que es caracteritzava pel desenvolupament d'un tumor a la regió frontal esquerra. Els autors van considerar que les característiques morfològiques d'aquest fong estaven dins els límits d'*S. schenckii*, no obstant, a part de les cèl·lules típiques de llevat d'*S. schenckii*, també van observar en el teixit humà algunes característiques que mai s'havien vist abans en aquesta espècie, com ara la presència de cèl·lules grans i esfèriques normalment septades i de paret més gruixuda, i la producció *in vitro* d'escleròtids quan creixia en agar farina de civada. Més tard, tres nous casos es van donar aparentment causats pel mateix fong [7, 8, 9]. El diagnòstic es va basar principalment en

la presència en teixit d'aquestes cèl·lules grans i de paret gruixuda amb configuració de "monocle" típic d' *S. schenckii* var. *luriei* i confirmant que pertanyia a *S. schenckii* per la fluorescència d'anticossos específics en dos dels casos [7, 9]. Els cultius només es van obtenir aparentment en un dels tres casos [8], però no es van preservar. Fins al moment, no s'han publicat més casos d'aquest fong.

Considerant les característiques peculiars d'*S. schenckii* var. *luriei* i que és un fong patògen molt poc conegut, hem estudiat molecularment i fenotípicament la única soca disponible que existeix (CBS 937.72) per tal de determinar si es pot considerar com una espècie diferent de les del complex d'*S. schenckii*.

Per tal de realitzar l'estudi filogenètic de diferents aïllats representatius de les diferents espècies d'*Sporothrix* vam amplificar i seqüenciar els gens de la quitina sintasa (CHS), la β -tubulina (Bt2) i la calmodulina (CAL) de la soca CBS 937.72, seguint el procediment descrit en Marimon *et al.* [1], i vam utilitzar un gran nombre de seqüències dipositades al GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>) (Taula 1).

Amb els primers utilitzats vam ser capaços d'amplificar i seqüenciar 304 pb, 452 pb i 685 pb dels loci CHS, Bt2 i CAL, respectivament. L'anàlisi combinada es va provar amb el test de partició homogènia per tal de detectar incongruències en l'agrupació dels tres loci, aquest test es troba en el programa PAUP* versió 4.0b10 [10]. El resultat ens mostrà que el conjunt de dades de les seqüències del tres locus eren congruents ($p=0.79$) i que, per tant, es podien combinar. Es van obtenir un total de 9 arbres parsimònics en la cerca heurística del conjunt dels 1441 nucleòtids seqüenciats. D'aquests caràcters, 1079 eren constants, 276 eren parsimònic informatius, i 86 eren variables parsimònic no informatius. Tots els arbres filogenètics (Fig. 1) van mostrar dos grans grups 100% suportats estadísticament. El primer es va dividir en quatre *subclades*, tres corresponents a cadascuna de les següents espècies *S. brasiliensis*, *S.*

globosa, *S. schenckii* i el quart un *subclade* basal que incloïa l'única soca d' *S. schenckii* var. *luriei*. El segon gran *clade* incloïa dos *subclades*, un corresponent a *S. albicans* i l'altre a *S. mexicana*.

TAULA 1. Espècies fúngiques, origen i nº d'accés al EMBL dels aïllats inclosos a l'estudi

Aïllat	Origen	Números d'accés			
		CHS	Bt2	CAL	
<i>S. albicans</i>					
CBS 302.73 (T)	Ambiental, Regne Unit	AM748692*	AM498343	AM398396	
CBS 111110	<i>Zootermopsis nevadensis</i> , Alemanya	AM748693*	AM747286*	AM398382	
<i>S. brasiliensis</i>					
CBS 120339 (T)	Clínica, Brasil	AM117417	AM116946	AM116899	
IPEC 16919	Clínica, Brasil	AM117407	AM116934	AM116898	
IPEC 22496.4	Clínica, Brasil	AM117413	AM116950	AM116895	
<i>S. globosa</i>					
CBS 120340 (T)	Clínica, Espanya	AM117422	AM116966	AM116908	
NBRC 6072	Desconegut	AM117420	AM116960	AM116904	
FMR 8595	Clínica, Espanya	AM117425	AM116959	AM116905	
<i>S. mexicana</i>					
CBS 120341 (T)	Ambiental, Mèxic	AM748696*	AM498344	AM398393	
CBS 120342	Ambiental, Mèxic	AM748697*	AM747288*	AM398392	
<i>S. schenckii</i>					
CBS 359.36 (T)	Clínica EUA	AM114872	AM116911	AM117437	
UTHSC 04-1064	Clínica, EUA	AM748694*	AM747285*	AM399014	
UTHSC 04-771	Clínica, EUA	AM748695*	AM747287*	AM398985	
<i>S. schenckii</i> var. <i>luriei</i>					
CBS 937.72 (T)	Clínica, Sud Àfrica	AM748698*	AM747289*	AM747302*	

*seqüències generades per l'estudi; (T) soca tipus.

Aquesta clara separació genètica d'*S. schenckii* var. *luriei* de la resta d'aïllats d'*S. schenckii* ja s'havia mostrat en un estudi filogenètic previ basat en l'anàlisi de seqüències d'ITS [3]. La taula 2 mostra les principals diferències entre les seqüències de les soques tipus de les espècies d'*Sporothrix* incloses en aquest estudi.

Taula 2. Nombre absolut de diferències entre les seqüències de nucleòtids de les soques tipus del complex d'*Sporothrix schenckii* incloses a l'estudi, comparat amb l'aïllat CBS 937.72.

Espècies	CHS	Bt2	CAL
<i>S. albicans</i>	20	67	121
<i>S. brasiliensis</i>	11	31	62
<i>S. globosa</i>	10	19	70
<i>S. mexicana</i>	18	63	124
<i>S. schenckii</i>	13	26	63

CHS: quitina sintasa; Bt2: β -tubulina; CAL: calmodulina

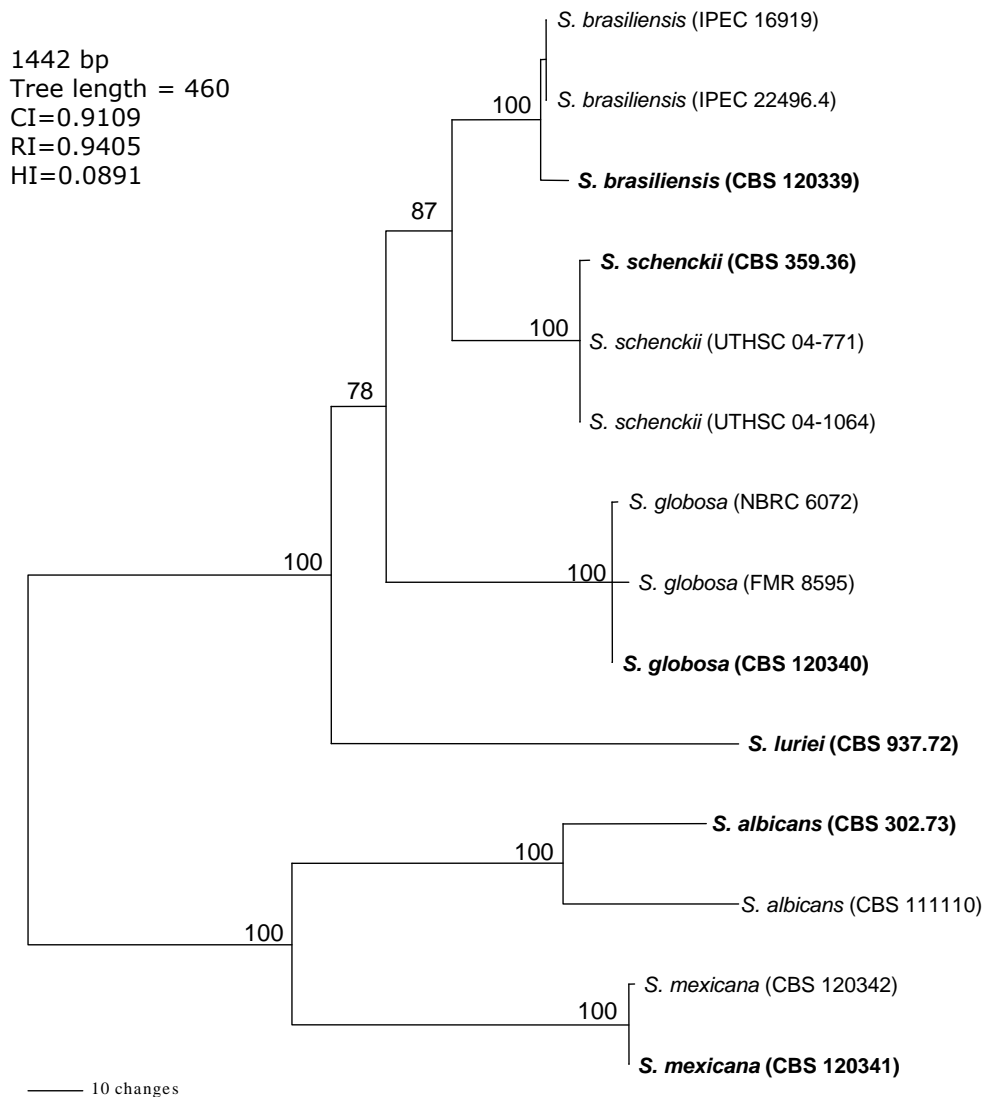


Fig. 1. Un dels 9 arbres més parsimoniosos obtinguts de la cerca heurística, de l'anàlisi combinada de les dades. Els índex de *bootstrap* superiors al 75% s'indiquen als nodes. CI, index de consistència; RI, index de retenció; HI, índex d'homoplàsia. Les soques tipus s'indiquen en negreta.

Per tal d'estudiar les característiques macroscòpiques de la soca CBS 937.72, aquesta es va cultivar en agar dextrosa patata (PDA, Difco), agar de farina de moresc (CMA; 30 g moresc, 15 g agar, 1 L aigua) i agar de farina de civada (OA; 30 g civada, 1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.5 g KH_2PO_4 , 15 g agar, 1 L aigua) a la foscor durant 21 dies a 30°C. Les característiques microscòpiques es van determinar fent microcultius en CMA als 10-12 dies a 30°C segons el procediment descrit a Marimon *et al.* [5]. En general, les colònies van ser molt semblants a les descrites per Ajello i Kaplan [6]. Eren humides, amb miceli aeri escàs i de coloració cremosa, essent més clares al centre (Fig. 2A). Els conidis naixien simpodialment, formant agrupaments normalment al final d'un conidiòfor no ramificat (Fig. 2 B, C), o naixien individualment pels costats de les hifes vegetatives (conidis sèssils) (Fig. B, D).

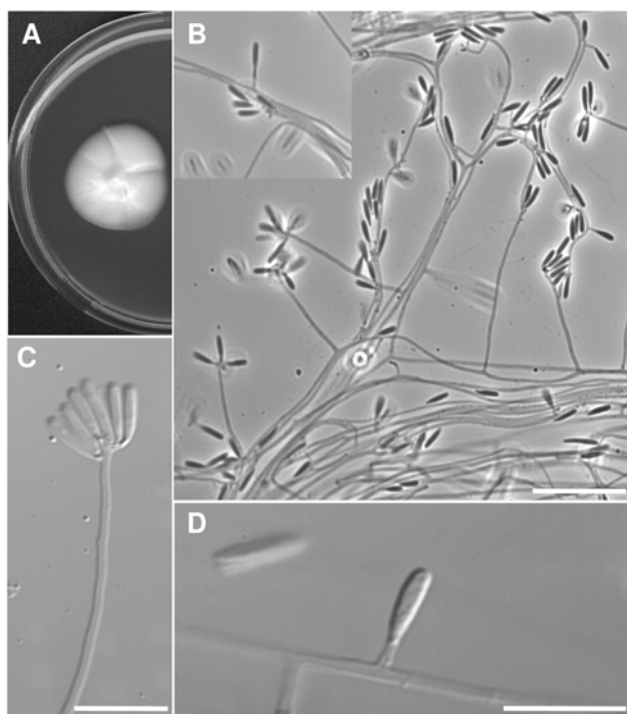


Fig. 2. *Sporothrix luriei* CBS 937.72. (A) Colonia en PDA a 30°C als 14 dies. (B) conidis sèssils simpodials. (C) conidis simpodials a l'extrem del conidiòfor. (D) Conidi sèssil sobre una hifa vegetativa. Barres (B) 25 µm, (C i D) 10 µm.

Tots els conidis eren hialins, generalment prims i obovats i mesuraven de 4 a 10 μm de llarg per 1 a 2 μm d'ample. Totes aquestes característiques morfològiques, però especialment la presència d'aquests conidis tant llargs, ens permeten diferenciar aquest aïllat de la resta d'espècies d'*Sporothrix*. A més, els conidis sèssils pigmentats, típics del complex d'espècies d'*S. schenckii*, no es troben en aquest fong. Tal i com ja van destacar Padhye *et al.* [9], nosaltres tampoc vam ser capaços d'observar les estructures escleròtides pigmentades descrites en el pròleg d' *S. schenckii* var. *luriei* [6]. Això pot ser degut a que aquest fong ha perdut l'habilitat de formar aquestes estructures després de repetits subcultius, o degut a les condicions de preservació.

A part de diferenciar-se genèticament, les espècies del complex d'*S. schenckii* també es poden diferenciar en base a la seva resposta al creixement a diferents temperatures i a l'assimilació d'alguns carbohidrats [5]. *S. schenckii* var. *luriei* va mostrar la seva temperatura òptima de creixement a 30°C (51 mm diam en PDA als 21 dies) i va ser incapaç de créixer a 40°C. Aquest aïllat va créixer més ràpidament a 35°C i a 37°C que la resta d'espècies del complex. Va ser capaç d'assimilar el ribitol i incapaç d'assimilar la sacarosa i la rafinosa. Aquests test van ser també útils per a la diferenciació d'aquest fong de la resta d'espècies d'*Sporothrix*.

Es va testar la sensibilitat als antifúngics del fong enfront de 10 antifúngics amb el mètode de microdil·lució, seguint les directrius del CLSI per a fongs miceliars [11]. Les concentracions mínimes inhibidores (en $\mu\text{g/ml}$) van ser les següents: terbinafina 0.25, posaconazol 0.5, flucitosina, ketoconazol i itraconazol 1, amfotericina B 2, albaconazol 16, fluconazol 128, i micafungina 256. La terbinafina va ser l'antifúngic més actiu, seguit pel posaconazol.

En base a aquests resultats, proposem que *S. schenckii* var *luriei* sigui elevat al nivell d'espècie amb la nova combinació *Sporothrix luriei* (Ajello & Kaplan) Marimon, Gené, Cano & Guarro comb. nov. La soca tipus d'*S. luriei*

es manté com a CBS 937.72, i la descripció per a l'espècie és la mateixa que la de la descripció original donada per *S. schenckii* var. *luriei* [6]. Les característiques claus per tal de distingir aquesta espècie de la resta de membres del complex d'*S. schenckii* es donen a la clau dicotòmica que es mostra a continuació.

Clau dicotòmica per a la identificació de les espècies del complex d'*Sporothrix schenckii*

1. Assimilació de la sacarosa negativa 2
 Sacarosa positiva 3
2. Colònies en PDA a 35°C no excedeixen els 30 mm diam. en 21 dies;
 conidis sèssils i pigmentats presents; conidis simpodials de 2 a 6 µm
 de longitud ***S. brasiliensis***
 Colònies en PDA a 35°C excedeixen els 30 mm diam. als 21 dies;
 conidis sèssils i pigmentats absents; conidis simpodials de 4 a 10 µm
 longitud ***S. luriei***
3. Colònies en PDA a 30°C excedeixen 50 mm diam. als 21 dies 4
 Colònies en PDA a 30°C no excedeixen 50 mm diam. als 21 dies 5
4. Assimilació de la rafinosa positiva; colònies en CMA marrons en 2
 setmanes ***S. mexicana***
 Rafinosa negativa; les colònies es mantenen incolores ***S. albicans***
5. Assimilació de la rafinosa negativa; temperatura màxima de
 creixement 35°C; conidis sèssils globosos o subglobosos ***S. globosa***
 Rafinosa positiva; temperatura màxima de creixement 37°C; conidis
 sèssils predominantment d'altres formes ***S. schenckii***

Agraïments

Aquest treball ha estat finançat pel Ministerio de Ciencia y Tecnología espanyol, concessions CGL 2004-00425/BOS i CGL 2005-07394.

Referències

1. Marimon R, Gené J, Cano J, Trilles L, Dos Santos Lazera M, Guarro J. Molecular phylogeny of *Sporothrix schenckii*. *J Clin Microbiol* 2006; **44**: 3251-3256.
2. O'Reilly LC, Altman SA. Macrorestriction analysis of clinical and environmental isolates of *Sporothrix schenckii*. *J Clin Microbiol* 2006; **44**: 2547-2552.
3. Watanabe S, Kawasaki M, Mochizuki T, Ishizaki H. RFLP analysis of the internal transcribed spacer regions of *Sporothrix schenckii*. *Jp J Med Mycol* 2004; **45**:165-175.
4. Zhang Z, Liu X, Yang G, Gao X, Jin L, An L. Genotyping of *Sporothrix schenckii* by analysis of ribosomal DNA regions. *Mycoses* 2006; **49**: 305-310.
5. Marimon R, Cano J, Gené J, Sutton DA, Kawasaki M, Guarro J. *S. brasiliensis*, *S. globosa* and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* species of clinical interest. *J Clin Microbiol* 2007; **45**: 3198-3206.
6. Ajello L, Kaplan W. A new variant of *Sporothrix schenckii*. *Mykosen* 1969; **12**: 633-644.

7. Alberici F, Paties CT, Lombardi G, Ajello L, Kaufman L, Chandler F.
Sporothrix schenckii var. *luriei* as the cause of sporotrichosis in Italy.
Eur J Epidemiol 1989; **5**:173-177.
8. Mercadal-Peyrí J, Bassas-Grau M, Sans-Macaró J, De Martín-Gassó C,
Mercadal-Peyrí JO. Two very rare clinical diseases in our climate:
cutaneous actinomycoses and blastomycosis of a vegetating type.
Mycopathol Mycol Appl 1965; **27**: 68-74.
9. Padhye AA, Kaufman L, Durry E, Banerjee CK, Jindal SK, Talwar P,
Chakrabarti A.. Fatal pulmonary sporotrichosis caused by *Sporothrix*
schenckii var. *luriei* in India. *J Clin Microbiol* 1992; **30**: 2492-2494.
10. Swofford DL. 2001. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony
(*and other methods) (version 4.0). Sinauer Associates, Sunderland,
Mass.
11. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Reference method
for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi*.
Approved standard. M38A. National Committee for Clinical Laboratory
Standards Wayne, Pa 2002.
12. Trilles L, Fernández-Torres B, Dos Santos Lazera M, Wanke B, De
Oliveira Schubach A, de Almeida Paes R, Inza I, Guarro J. In vitro
antifungal susceptibilities of *Sporothrix schenckii* in two growth phases.
Antimicrob Agents Chemother 2005; **49**: 3952-3954.

4.5 Diferències en la virulència d'espècies d'*Sporothrix* d'interès clínic en un model murí.

Aquest estudi ha estat sotmès a la revista *Microbes and Infection* (veure Annex 6) amb el format de treball original que es mostra a continuació.

Resum

S'ha realitzat un estudi comparatiu sobre la patogenicitat de cinc espècies d'*Sporothrix* d'interès clínic, *S. schenckii sensu stricto*, *S. brasiliensis*, *S. mexicana*, *S. globosa* i *S. albicans*, en un model animal de ratolins immunocompetents. Es van testar dos soques corresponents a cada espècie. Per cada soca es van assajar dos inòculs: 1×10^8 (alt) i 1×10^5 (baix) conidis/ml. Sols l'inòcul baix d'una soca d'*S. brasiliensis* i l'inòcul alt d'*S. brasiliensis* i *S. mexicana* van ser capaços de provocar la mort dels animals (100% mortalitat). La resta d'inòculs no van produir la mort de cap animal, ni cap tipus de lesió.

Introducció

L'esporotricosi és una malaltia crònica subcutània causada pel fong dimòrfic *Sporothrix schenckii* que es caracteritza pel desenvolupament de nòduls limfàtics en homes i en alguns animals. La inoculació de la forma miceliar del fong és a través de la pell pel contacte amb terra, plantes, i material vegetal en general, ja que aquest fong es troba en hàbitats rics en matèria orgànica i en regions de clima càlid i humit [1]. En els últims anys la incidència d'aquesta infecció ha augmentat gradualment en homes, majoritàriament veterinaris, infermers i propietaris de gats, els quals es

solen infectar a través d'esgarrapades o mossegades o, fins i tot, per contacte directe amb supuracions de lesions felines [2].

Alguns estudis mostren que aïllats obtinguts de mostres clíniques són més patogènics que aquells aïllats de l'ambient [1, 3]. Fins ara es creia que *S. schenckii* era una espècie ben definida i genèticament poc variable, però recentment estudis moleculars han demostrat que aquest fong és en realitat un complex d'espècies filogenètiques amb diferents distribucions geogràfiques [4, 5]. Apart d'*S. schenckii sensu stricto*, tres noves espècies d'aquest complex s'han aconseguit caracteritzar fenotípicament; són *S. brasiliensis* i *S. globosa* associades a infeccions humanes i *S. mexicana* de soques d'origen ambiental [6]. Es desconeix si els diferents tipus d'infecció amb diferents graus de severitat atribuïts a *S. schenckii* corresponen a diferents espècies del complex o si són causats per diferents aïllats de la mateixa espècie. Es necessiten més estudis per determinar aquestes qüestions. En aquest sentit prèviament vam demostrar que les espècies del complex mostren diferent grau de sensibilitat antifúngica [Marimon, R., Serena, C., Gené, J., Cano, J. and Guarro, J. In vitro antifungal susceptibilities of 5 species of *Sporothrix*. "unpublished"]. En aquest estudi hem comparat la virulència de les diferents espècies del complex en un model murí d'infecció disseminada.

Materials i mètodes

Fongs i preparació dels inòculs

Per realitzar aquest estudi es van utilitzar deu soques de *Sporothrix* spp., dues de cadascuna de les espècies següents: *S. schenckii*, *S. brasiliensis*, *S. globosa*, *S. mexicana* i *S. albicans* (Taula 1). Les soques es tenien guardades en tubs d'agar de farina de moresc (30 g moresc, 15 g agar, 1 L d'aigua) coberts amb oli de parafina, i abans del seu estudi es van sembrar en agar dextrosa patata (PDA) durant 8 dies a 30°C. Per cada aïllat es van preparar dos inòculs, d' 1×10^8 conidis/ml (alt) i 1×10^5 conidis/ml

(baix) amb excepció de la soca d'*S. brasiliensis* CBS 120339, en que l'inòcul alt va ser de 6×10^6 conidis/ml.

L'inòcul es va preparar cobrint la superfície de la placa d'agar amb solució salina i es va rascar el miceli esporulat amb la punta d'una pipeta Pasteur estèril, la suspensió resultant es filtrava a través d'una gassa estèril per tal d'eliminar les hifes. El nombre de conidis de la suspensió es va contar amb la camera de Neubauer i es va ajustar a les concentracions desitjades. La viabilitat d'aquestes concentracions es verificava sembrant dilucions de les suspensions en plaques amb PDA.

Taula 1. Aïllats d'*Sporothrix* spp. Inclosos a l'estudi i els seus orígens

Espècies	Soca	Origen
<i>S. schenckii</i>	UTHSC 99-173	Biòpsia del teixit de la mà, EUA
	UTHSC 01-2137	Úlcera de la pell, EUA
<i>S. brasiliensis</i>	CBS 120339	Lesió cutània, Brasil
	IPEC 16919	Lesió cutània, Brasil
<i>S. globosa</i>	CBS 120340	Lesió a la cara, Espanya
	MCCL 220082	Desconegut, Índia
<i>S. mexicana</i>	CBS 120341	Terra, Mèxic
	CBS 120342	Fulles de clavell, Mèxic
<i>S. albicans</i>	CBS 302.73	Terra, Regne Unit
	KMU4217	Blat, Xina

Abreviacions: UTHSC, Univesity of Texas Health Science center, EUA; MCCL, Mycology Culture Collection Laboratory, Postgraduate Institute of Medical Education and Research, Chandigarh, Índia; IPEC, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fiocruz, Brasil; CBS, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Holanda; KMU Kanazawa Medical University, Ishikawa, Japó.

Animals.

Es van utilitzar ratolins OF1 mascles (Charles River, Criffa SA, Barcelona, Espanya) amb un pes d'uns 32 g. Els animals es van estabular en grups de 10 en gàbies amb accés lliure al menjar i a la beguda. Les condicions d'estabulació i manipulació dels animals van ser aprovades pel Comitè Ètic de la Facultat de Medicina de la URV.

Infecció

S'establiren 21 grups de 10 ratolins, 2 per a cada un dels inòculs i per a cada soca i un de control que consistia en animals no infectats. Es van injectar 200 µl de les suspensions de l'inòcul a través de la vena lateral de la cua. Els diferents grups es varen examinar diàriament per determinar la taxa de mortalitat, fins al dia 40 des de l'inici de la infecció.

Anàlisi estadístic

El temps mig de supervivència (MST) es va estimar amb el mètode de Kaplan-Meier i es va comparar entre els grups amb el test de log-rank. Valors de $P < 0.05$ es van considerar com a estadísticament significatius

Resultats

Els resultats indiquen clarament que hi ha una correlació entre la concentració de l'inòcul i la mortalitat. A la concentració d'inòcul més baix, 1×10^5 la soca IPEC 16919 d'*Sporothrix brasiliensis* va ser la única que va causar la mortalitat de tots els ratolins entre els dies 30 i 37, mentre que totes les altres soques investigades no van mostrar patogenicitat, donant un 100% de supervivència. A la concentració de 1×10^8 , els ratolins infectats amb les soques de *S. mexicana*, *S. albicans* i *S. globosa* no van mostrar mortalitat durant els 40 dies d'observació. En canvi tots els animals infectats amb *S. brasiliensis* i *S. schenckii* van morir entre els dies 9 i 23, no mostrant diferències significatives entre cap d'aquestes quatre soques ($P > 0.05$) (Fig.1).

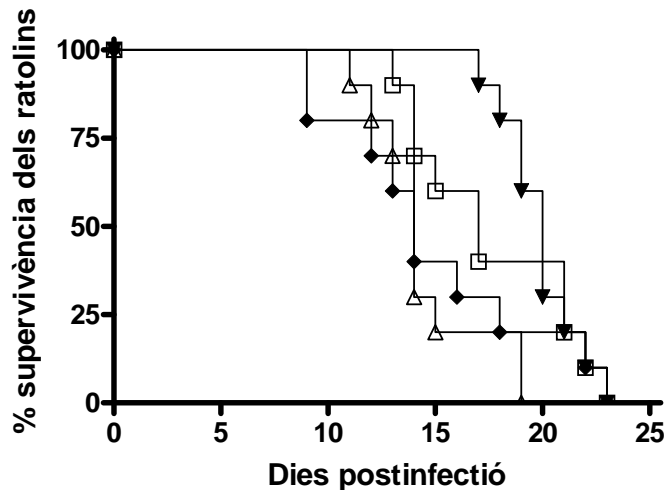


Fig.1 Supervivència dels ratolins infectats amb *Sporothrix* spp. Els ratolins van ser infectats amb 1×10^8 conidis, amb excepció de la soca CBS 120339 la qual va ser de 6×10^6 , i es van observar durant 40 dies. *S. schenckii* aïllats UTHSC 99-173 (□) i UTHSC 01-2137 (Δ), *S. brasiliensis* aïllats CBS 120339 (▼) i IPEC 16919 (◆).

La majoria dels ratolins infectats amb els dos inòculs d'*S. brasiliensis* i *S. schenckii* van mostrar lesions cutànies a la cua (Fig.2) i inflamació dels testicles. en canvi els ratolins infectats amb les altres tres espècies no van mostrar cap tipus de lesió aparent, a cap de les concentracions testades.

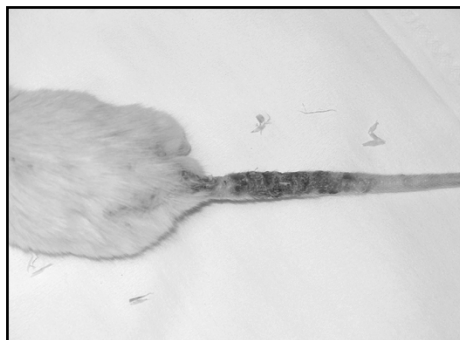


Fig. 2. Esporetriosi experimental. Noduls ulcerosos a la cua d'un ratolí infectat amb la soca IPEC 16919.

Totes les soques que han mostrat virulència són totes d'origen clínic, amb excepció de les d'*S. globosa* que tot i ser també d'origen clínic no va causar la mort de cap animal.

Discussió

Prèviament alguns autors ja havien estudiat la virulència de diferents soques d'*S. schenckii* [7, 8, 9], no obstant, els seus resultats són difícils de comparar amb els nostres ja que es desconeix a quina de les espècies actualment acceptades d'*Sporothrix* es referien.

Dixon *et al.* (1992) van estudiar 60 soques ambientals aïllades d'una epidèmia d'esperotricosi als EUA l'any 1988, i relacionen el % de mortalitat que causen els aïllats testats amb la capacitat de créixer de les soques a 37°C, la producció de conidis pigmentats i el seu origen (clínic o ambiental). Conclouen que les soques ambientals, que no produïen conidis pigmentats, no eren virulentes, el que concordaria amb els resultats que nosaltres hem obtingut per *S. albicans*. Les dues soques assajades d'aquesta espècie són ambientals no pigmentades i no han provocat la mort dels ratolins. També van estudiar dos aïllats ambientals que produïen conidis pigmentats i creixien a 35°C, però no a 37°C, els quals no van resultar virulents. Aquests fets concorden amb els resultats obtinguts amb les soques d'*S. globosa*, que tot i que les dues soques d'aquesta espècie investigades en el present estudi són d'origen clínic, l'espècie comprèn tant soques clíniques com d'origen ambiental amb conidis pigmentats i capaces de créixer a 35°C, però no a 37°C. En canvi però, els nostres resultats es contradiuen amb els obtinguts per Mackinnon *et al.* [8]. En l'esmentat treball les soques estudiades amb conidis pigmentats produïen infeccions als testicles i a la cua dels ratolins. En el nostre estudi *S. mexicana* i *S. globosa* són soques pigmentades però no han produït lesions als ratolins.

Més recentment, Mesa-Arango *et al.* [4] van comparar la virulència d'aïllats de diferents regions geogràfiques i no van trobar cap relació entre elles. No obstant, en general les soques ambientals van ser les que van mostrar més virulència, això contrasta amb els nostres resultats, en que la virulència més elevada l'hem trobat en soques d'origen clínic.

Concloent, els resultats d'aquest estudi revelen diferències significatives en el grau de virulència entre les diferents espècies d'*Sporothrix*, sent els aïllats d'*S. schenckii* i *S. brasiliensis*, tots ells clínics, clarament més virulents que la resta. Ara que coneixem que existeixen diferències en la virulència i en la resposta als antifúngics [Marimon, R., Serena, C., Gené, J., Cano, J. and Guarro, J. In vitro antifungal susceptibilities of 5 species of *Sporothrix*. "unpublished"] entre les diferents espècies del complex d'*Sporothrix schenckii*, és important identificar aquestes espècies en el camp clínic. Aquest fet és crucial per al correcte tractament d'aquestes infeccions i per millorar el coneixement de la seva epidemiologia. Aquesta feina es pot facilitar amb l'ús de les tècniques moleculars i fenotípiques recentment descrites [6].

Agraïments

Els autors agraeixen als directores de les col·leccions de cultius que es mostren a la Taula 1 pel subministrament de la majoria de les soques utilitzades en aquests estudi. Aquest treball ha estat finançat pel *Ministerio de Ciencia y Tecnología Español*, concessió CGL 2004-00425/BOS i CGL 2005-07394.

Referències

- [1] G.H. Findlay, H.F. Vismer. Studies in sporotrichosis: fungal morphogenesis and pathogenicity in differing environments. Mycopathologia. 96 (1986)115-22.
- [2] M. de O. Nobre, T. de A. Antunes, R.O. de Faria, M.B. Cleff, C.G. Fernández, A.C. Muschner, M.C. Meireles, L. Ferreiro. Differences in virulence between isolates of feline sporotrichosis. Mycopathologia. 160 (2005)43-49.
- [3] D.M. Dixon, R.A. Duncan, N.J. Hurd. Use of a mouse model to evaluate clinical and environmental isolates of *Sporothrix* spp. from the largest U.S. epidemic of sporotrichosis. J. Clin. Microbiol. 30 (1992) 951-954.
- [4] A.C. Mesa-Arango, M. Del Rocío Reyes-Montes, A. Pérez-Mejía, H. Navarro-Barranco, V. Souza, G. Zúñiga, C. Toriello. Phenotyping and genotyping of *Sporothrix schenckii* isolates according to geographic origin and clinical form of sporotrichosis. J. Clin. Microbiol. 40 (2002) 3004-3011.
- [5] R. Marimon, J. Gené, J. Cano, L. Trilles, M. Dos Santos Lazera, J. Guarro. Molecular phylogeny of *Sporothrix schenckii*. J. Clin. Microbiol. 44 (2006) 3251-3256.
- [6] R. Marimon, J. Cano, J. Gené, D.A. Sutton, M. Kawasaki, J. Guarro. Three new *Sporothrix* species of clinical interest: *S. brasiliensis*, *S. globosa* and *S. mexicana*. J. Clin. Microbiol. (2007) J. Clin. Microbiol. doi:10.1128/JCM.00808-07.
- [7] D.H. Howard, G.F. Orr. Comparison of strains of *Sporotrichum schenckii* isolated from nature. J. Bacteriol. 85 (1963) 816-821.

[8] J. Mackinnon, I. Conti-Diaz, E. Gezuele, E. Civila, S. da Luz. Isolation of *Sporothrix schenckii* from nature and considerations on its pathogenicity and ecology. *Sabouraudia* 7 (1969) 38-45.

[9] R. Ferreti de Lima, G. Vidal Schäffer, C. de Moraes Borba. Variants of *Sporothrix schenckii* with attenuated virulence for mice. *Microbes Infect.* 5 (2003) 933-938

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

FILOGÈNIA MOLECULAR I CARACTERITZACIÓ FENOTÍPICA DEL COMPLEX D'ESPÈCIES DE
SPOROTHRIX SCHENCKII

Rita Marimón Picó

ISBN: 978-84-691-1554-1 /DL:T.147-2008

5. DISCUSSIÓ GENERAL

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

FILOGÈNIA MOLECULAR I CARACTERITZACIÓ FENOTÍPICA DEL COMPLEX D'ESPÈCIES DE
SPOROTHRIX SCHENCKII

Rita Marimón Picó

ISBN: 978-84-691-1554-1 /DL:T.147-2008

5. DISCUSSIÓ GENERAL

5.1 Estudi molecular

Sporothrix schenckii és el fong responsable de l'espótricosi, una infecció crònica de la pell i dels teixits subcutanis, encara que pot disseminar afectant a qualsevol òrgan del cos humà. Aquesta infecció està mundialment distribuïda, però és més comú de les zones tropicals i subtropicals sent la infecció subcutània més comú de Sud Amèrica. Tot i la gran importància clínica d'aquest fong es coneix poc la seva biologia i la seva estructura poblacional. És important que els clínics coneguin les seves diverses formes clíniques, els mètodes de diagnòstic d'aquestes, i les diferents opcions de tractament de l'espótricosi, per tal d'assegurar l'òptima cura dels pacients afectats per aquesta malaltia.

En els últims anys s'han realitzat nombrosos estudis moleculars referents a *S. schenckii* (Ishizaki *et al.* 1998, Ishizaki *et al.* 2002, Mesa-Arango *et al.* 2002, Watanabe *et al.* 2004, Neyra *et al.* 2005, O'Reilly *et al.* 2006, Zhang *et al.* 2006a) i s'ha demostrat clarament l'existència de grups genèticament diferents. Aquest no és un fet aïllat, sinó que s'ha demostrat també en altres fongs d'importància clínica, com és el cas de *Pneumoyistis carinii* P. Delanoë & Delanoë (Beard *et al.* 2000), *Coccidioides immitis* (Koufopanou *et al.* 2001), *Aspergillus fumigatus* Fresen (Pringle *et al.* 2005), *Candida parapsilosis* (Ashford) Langeron & Talice (Tavanti *et al.* 2005) o *Pseudallescheria boydii* (Shear) McGinnis, A.A. Padhye & Ajello (Gilgado *et al.* 2005), entre altres. Aquests estudis han demostrat que les fins el moment considerades espècies úniques, en realitat, són un complex d'espècies diferents, difícils de distingir fenotípicament, però sovint amb característiques clíniques i epidemiològiques diferents.

El nostre estudi, una vegada més, confirma la gran variabilitat genètica existent entre les soques identificades morfològicament com a *S. schenckii*, el que ens indica que es tracta clarament d'un complex d'espècies

críptiques. En una primera anàlisi filogenètica utilitzant la informació combinada de 3 loci (beta-tubulina, calmodulina i quitina sintasa), en un total de 60 soques es varen detectar 29 genotips, els quals s'agrupaven en 6 *clades* principals (veure Fig. 1 de l'apartat 4.1) que podrien representar un mínim de 6 espècies filogenètiques putatives. En aquests *clades* les soques mostraven una clara distribució segons el seu origen geogràfic. Entre els *clades* I i III es distribuïen les soques del continent americà i d'Àfrica, mentre que en el *clade* III s'hi concentraven les soques d'Europa. La distribució geogràfica mostrada per les nostres soques seguia un patró de distribució molt similar al de soques d'*S. schenckii* estudiades per altres autors mitjançant altres tècniques moleculars (Ishizaki *et al.* 1998, Mesa-Arango *et al.* 2002, Ishizaki 2003, Neyra *et al.* 2005). Watanabe *et al.* (2004) varen analitzar els RFLPs d'un total de 204 aïllats d'*S. schenckii*, els quals es varen distribuir bàsicament en 4 patrons diferents. El tipus I era predominant d'Àfrica i Sud Amèrica, el tipus II de Sud Amèrica, el tipus III de Nord Amèrica i el tipus IV d'Austràlia i Àsia, una distribució geogràfica similar a la obtinguda en el nostre estudi. En el nostre cas però, al no disposar de soques del continent australià, les soques d'Àsia es varen agrupar amb les europees. Això coincideix amb l'estudi d'Ishizaki *et al.* (2004) en que utilitzant mtDNA-RFLP, els aïllats europeus (tots d'Espanya) s'agrupaven en el mateix grup filogenètic que incloïa aïllats de Corea, Xina i Japó.

El patró biogeogràfic mostrat en tots aquests estudis sembla que es relaciona amb els esdeveniments associats a la formació de les barreres naturals creades per la fragmentació de l'antic supercontinent Gondwana, del període Cretaci superior al període Paleocè, fa 100 milions d'anys amb el consegüent aïllament de les espècies. Un cas similar podria explicar el procés d'especiació observat en el complex d'espècies *Gibberella fujikuroi* (Sawada) Wollenw, tal i com indicaven O'Donnell *et al.* (1998). La separació dels continents, i la formació de barreres naturals van facilitar segurament el fenomen d'especiació de les poblacions primitives per convertir-se en

espècies endèmiques de diferents regions. No obstant, malgrat que la separació geogràfica dels grans grups és evident, els diferents genotips presents en ells no estan relacionats amb la geografia, la qual cosa sembla indicar que hi ha hagut creuaments dins dels aïllats de cada població.

D'altra banda, en cap dels estudis moleculars realitzats fins al moment, inclòs el nostre, s'ha trobat una correlació genètica respecte als diferents tipus d'infecció o manifestacions clíniques produïdes per les soques estudiades. Hi ha autors que apunten la possibilitat que aquest és un fet condicionat principalment per l'estat de salut del propi pacient (Neyra *et al.* 2005, Zhang *et al.* 2006a). Però el cert és que encara queda molta feina per fer en aquest sentit.

Amb l'objectiu de delimitar més clarament les espècies filogenètiques detectades en l'estudi multigènic i determinar que realment es tractaven d'espècies no descrites anteriorment vam realitzar un nou estudi molecular incrementant el nombre de soques de diferents orígens identificades morfològicament com a *S. schenckii*, a més a més d'incloure no solament la soca tipus d'*S. schenckii*, sinó també les soques tipus d'altres espècies morfològicament similars com *S. inflata*, la de la varietat *S. schenckii* var. *luriei* o d'espècies actualment considerades sinònimes d'*S. schenckii* com *Sporothrix albicans*, *Sporotrichum tropicale* i *Dolichoascus schenckii*. En total vàrem reunir 142 soques, de les quals es va analitzar una part de la seqüència del gen de la calmodulina de 685 pb, el gen que ens havia proporcionat més informació sobre la filogenia d'aquest complex d'espècies en el primer estudi molecular (Marimon *et al.* 2006). Els resultats obtinguts van ser molt similars als d'aquest estudi previ, mantenint-se la distribució de soques segons els *clades* indicats anteriorment.

El *clade* I era el més uniforme genèticament. Aquest estava constituït quasi únicament per soques del Brasil que procedien d'un brot epidèmic d'esporetriosi que es va donar entre 1998-2001 (Schubach *et al.* 2004, 2005), el que podia fer pensar que totes aquestes soques fossin clòniques i

procedissin d'una sola soca molt virulenta d'*S. schenckii*. Però després d'incloure més soques del Brasil de llocs molt diferents i, a la vegada, veure que entre les soques del brot hi havia diferents genotips va quedar palès que això no era així. A més quedava clarament demostrat que aquest *clade* era una espècie diferent i desconeguda per a la ciència perquè es situava filogenèticament molt distant del *clade* II on s'ubicava la soca tipus d'*S. schenckii*.

El *clade* II és per tant el representatiu d'*S. schenckii*, però a la vegada és el genèticament més heterogeni i el que probablement inclou un major nombre d'espècies críptiques. En aquest *clade* es va ubicar també la soca tipus de *D. schenckii*, demostrant el que Mariat i Diez (1971) i de Hoog (1974) havien suposat en el seu moment de que aquesta espècie és un mer aïllar d'*S. schenckii*. Recordem d'altra banda, que aquest *clade* II està constituït bàsicament per soques americanes, però curiosament també inclou una soca procedent d'Àfrica, l'única soca d'aquest continent que disposem en el nostre estudi. Per tant, caldrà encara realitzar un futur estudi amb més soques procedents d'Àfrica per a poder confirmar la seva ubicació i, a la vegada, conèixer més acuradament l'evolució *S. schenckii* en aquest continent.

Molt separat filogenèticament dels *clades* I i II es troba el *clade* III, el qual està constituït bàsicament per soques d'Àsia i soques europees i, entre elles, la soca tipus *Sporotrichum tropicale* procedent d'Anglaterra. Aquest *clade* representa clarament una espècie diferent a *S. schenckii*, però des del punt de vista nomenclatural no pot adoptar el nom d'*S. tropicale* ja que aquesta espècie és considerada invàlida al no estar descrita originalment en llatí (Panja *et al.* 1947, Kirk *et al.* 2001).

El *clade* IV el formen exclusivament dos soques ambientals de Mèxic. Tot i procedir del continent americà sembla ser que el tret que les diferencia de la resta de soques americanes incloses en els *clades* I i II és el fet de tenir un origen ambiental. Però per a determinar això es caldria, en un futur

realitzar un estudi més ampli que inclogués més soques mexicanes, tant d'origen ambiental com clínic.

Al *clade* V, constituït també només per soques ambientals, hi trobem la soca tipus d'*S. albicans*, una espècie considerada per de Hoog (1974) sinònima d'*S. schenckii*. El nostre estudi demostra que són genèticament molt diferents i que, per tant, *S. albicans* s'ha de considerar d'aquí en endavant una espècie diferent d'*S. schenckii*.

Quelcom similar és el que passa amb *S. schenckii* var. *luriei*. Aquest fong va ser descrit com una varietat bàsicament per que mostrava uns trets infecciosos diferents als descrits per *S. schenckii* (Ajello i Kaplan, 1969). Aquest és un fong rar del que es coneixen relativament pocs casos (Mercadal-Peyrí *et al.* 1965, Ajello i Kaplan 1969, Alberici *et al.* 1989, Padhye *et al.* 1992) en comparació als casos descrits del seu congènere, i del que tan sols es conserva una sola soca, per sort, la originalment aïllada per Ajello i Kaplan el 1969. Watanabe *et al.* (2004), al seqüenciar la regió dels ITSs i comparar-la amb la d'altres soques d'*S. schenckii*, ja varen posar de manifest que era diferent; una qüestió que ha quedat confirmada en el nostre estudi multigènic.

Ara bé, el que calia fer, no tan sols amb aquesta varietat sinó també amb la resta de grups genètics diferenciats, era veure si érem capaços de trobar diferències fenotípiques entre ells, d'una banda per poder descriure formalment aquelles espècies que resten encara desconegudes per a la ciència i d'altra banda facilitar els trets fenotípics claus per a que laboratoris convencionals que no disposen d'equipament molecular puguin realitzar la seva identificació.

5.2 Estudi fenotípic

Amb la finalitat de caracteritzar fenotípicament els diferents grups genètics i poder determinar diferències entre ells, vam realitzar un exhaustiu estudi morfològic de totes les soques i vam assajar un ampli ventall de proves fisiològiques com ara la capacitat de créixer a diferents temperatures, l'assimilació de carbohidrats i compostos nitrogenats, etc. (Marimon *et al.* 2007). Altres autors ja han intentat correlacionar característiques morfològiques amb alguns caràcters fisiològics o moleculars en diferents soques d'*S. schenckii* (Howard i Orr 1963, Mesa-Arango *et al.* 2002, O'Reilly *et al.* 2006), però sense arribar a cap conclusió que els hi permetés distingir diferents taxons.

En el nostre cas, l'estudi morfològic de la forma miceliar de totes les soques creixent en CMA a 30°C ens ha permès determinar que dels dos tipus de conidis que acostuma a produir *S. schenckii* (Mariat *et al.* 1962, de Hoog 1974), la presència o absència i la morfologia dels conidis definits com a sèssils i pigmentats, és el caràcter clau per a distingir alguns dels grups moleculars abans indicats. Els *clades* I i III mostren conidis sèssils globosos o subglobosos. Les soques del *clade* II presenten conidis sèssils que són triangulars, cuneiforms o de forma irregular en major o menor grau. En els membres del *clade* IV aquests conidis són predominantment obovoids o elipsoidals i una mica més grossos que la resta. I, per últim, les soques del *clade* V mai van desenvolupar conidis sèssils pigmentats.

D'altra banda, malgrat que vàrem avaluar la resposta de més de 40 proves fisiològiques (veure Annex 7) només l'assimilació de la sacarosa, la rafinosa i el ribitol, i les temperatures de creixement de 35-37°C ens han servit per a la taxonomia del complex. Hi ha molts pocs estudis sobre la fisiologia d'*S. schenckii* (Travassos *et al.* 1980, Dixon *et al.* 1991, Ghosh *et al.* 2002), fins i tot alguns mostren resultats contradictoris entre ells o amb els obtinguts en el nostre estudi. Això podria ser conseqüència de la

utilització de diferents metodologies, o també per la barreja d'organismes que fins al moment hi havia sota el denominador comú d'*S. schenckii*.

El resultat més interessant i útil de la present tesi ha estat el trobar una clara correlació entre les dades moleculars i les característiques fenotípiques entre les diferents soques estudiades de *S. schenckii*, la qual cosa ens ha permès diferenciar d'*S. schenckii* dos noves espècies clíniques (*S. brasiliensis* i *S. globosa*) i una ambiental (*S. mexicana*) i considerar a *S. albicans* i *S. schenckii* var. *lurie* com espècies diferents.

Seguint la clau dicotòmica inclosa més endavant, amb unes poques proves fisiològiques i l'examen dels caràcters morfològics indicats, permetrà als microbiòlegs clínics la fàcil identificació d'aquests fongs sense la necessitat d'utilitzar tècniques moleculars.

Clau dicotòmica per a la identificació de les espècies del complex d'*Sporothrix schenckii*

1. Assimilació de la sacarosa negativa..... 2
Sacarosa positiva..... 3
2. Colònies en PDA a 35°C no excedeixen els 30 mm diam. en 21 dies;
conidis sèssils i pigmentats presents; conidis simpodials de 2 a 6 µm
de longitud ***S. brasiliensis***
Colònies en PDA a 35°C excedeixen els 30 mm diam. als 21 dies;
conidis sèssils i pigmentats absents; conidis simpodials de 4 a 10 µm
longitud..... ***S. luriei***
3. Colònies en PDA a 30°C excedeixen 50 mm diam. als 21 dies 4
Colònies en PDA a 30°C no excedeixen 50 mm diam. als 21 dies 5
4. Assimilació de la rafinosa positiva; colònies en CMA marrons en 2
setmanes..... ***S. mexicana***
Rafinosa negativa; les colònies es mantenen incolores ***S. albicans***
5. Assimilació de la rafinosa negativa; temperatura màxima de
creixement 35°C; conidis sèssils globosos o subglobosos.... ***S. globosa***
Rafinosa positiva; temperatura màxima de creixement 37°C; conidis
sèssils predominantment d'altres formes ***S. schenckii***

5.3. Estudi de sensibilitat *in vitro* als antifúngics

El tractament de l'espótricosi és bàsicament sistèmic. A Sud Amèrica i Centre Amèrica la utilització de l'IK és encara el tractament d'elecció degut al seu baix cost, no obstant és un tractament que té molts efectes secundaris (Sterling i Heymann 2000, Leshner *et al.* 1994) tal i com s'ha indicat a l'introducció (pag. 17). Altres fàrmacs comunament utilitzats són l'ITC pel tractament de les infeccions limfocutànies (Conti *et al.* 1992, Sharkey-Mathis *et al.* 1993, Lortholary *et al.* 1999), i l'AMB per a les infeccions més severes o quan la teràpia amb ITC falla (Kauffman *et al.* 2000). Encara que aquests fàrmacs són generalment efectius, la llarga duració dels tractaments i la toxicitat de l'AMB fan necessària l'exploració de noves alternatives pel tractament de les infeccions més severes.

Alguns estudis han mostrat resultats de sensibilitat a certs antifúngics variables entre les soques d'una mateixa espècie, i certs autors han conclòs que la sensibilitat als antifúngics és dependent de cada soca (Johnson *et al.* 1998, McGinnis *et al.* 2001 i Trilles *et al.* 2005). Això es podria explicar pel fet que *S. schenckii* no era una sola espècie, sinó un complex d'espècies críptiques, tal i com s'ha demostrat amb els nostres estudis moleculars (Marimon *et al.* 2006, 2007).

En el nostre estudi vam trobar diferències en quan a la sensibilitat de certs antifúngics dependent de l'espècie d'*Sporothrix* estudiada. Així per exemple, el KTC va mostrar activitat davant de totes les espècies, excepte *S. mexicana* i *S. albicans*. El RVC i l'ITC només van mostrar activitat enfront de *S. brasiliensis*, mentre que per les altres espècies van mostrar valors de CMIs molt elevats. Malgrat aquests resultats *in vitro*, l'ITC mostra ser efectiu en clínica, (Conti *et al.* 1992, Sharkey-Mathis *et al.* 1993, DeHart *et al.* 1995, Baroni *et al.* 2007), essent per tant l'antifúngic d'elecció per combatre aquestes infeccions.

En el nostre estudi la TBF va ser l'antifúngic que va mostrar una millor activitat per totes les espècies. No obstant, degut a la seva naturalesa

altament lipofílica, és un antifúngic que es distribueix principalment per la pell, ungles i teixit adipós (Elewski 1998), el que el fa adequat només per infeccions d'espótricosis cutànies i limfocutànies. En el cas d'infeccions severes o sistèmiques creiem que el PSC seria una bona opció terapèutica ja que el seu resultat *in vitro* ha sigut millor que el de l'AMB o l'ITC, almenys enfront de *S. brasiliensis*, *S. albicans* i *S. schenckii*. No obstant, es necessitarien estudis *in vivo* per confirmar la seva eficàcia.

Cap dels antifúngics provats va mostrar bona activitat front a *S. mexicana* i *S. globosa*, per tant seria interessant realitzar estudis de combinacions d'antifúngics per tal de trobar una teràpia efectiva.

5.4 Estudi de patogenicitat

La patogènia d'*Sporothrix schenckii* ja havia estat estudiada per altres investigadors (Howard i Orr 1963, Mackinnon *et al.* 1969, Mesa-Arango *et al.* 2002, Ferreti de Lima *et al.* 2003), però els resultats obtinguts en aquests estudis són difícils de comparar amb els nostres ja que no se sap a quina de les espècies del complex d'*S. schenckii* fan referència. Els resultats del present estudi mostren que la capacitat patògena de les espècies del complex és diferent, essent, *S. schenckii* i *S. brasiliensis* les espècies més patògenes i sent *S. brasiliensis* l'única espècie que va causar mortalitat en els ratolins a la concentració d'inòcul més baix testada.

Dixon *et al.* (1992), en un estudi fet amb soques d'una epidèmia d'esporeticosi als Estats Units l'any 1988, van relacionar la virulència d'aquestes amb la capacitat de créixer de les soques a 37°C, la producció de conidis pigmentats i el fet de ser d'origen clínic o ambiental. En aquell estudi les soques ambientals que no produïen conidis pigmentats no eren virulentes, el que concordaria amb els resultats que nosaltres hem obtingut per *S. albicans*; recordem que aquesta espècie és ambiental i no pigmentada. En el treball de Dixon *et al.* (1991) també es van estudiar dues soques ambientals que tenien la capacitat de pigmentar i eren incapaces de créixer a 37°C; aquestes soques no van provocar la mort dels ratolins. Aquests resultats estarien en la línia dels obtinguts en el nostre estudi referent a *S. globosa* que tot i haver utilitzat dues soques d'origen clínic, aquesta és una espècie que comprèn tant soques clíniques com ambientals, pigmentades i sense la capacitat de créixer a 37°C. En el nostre estudi *S. globosa* tampoc va produir infecció a ratolins

Mackinnon *et al.* (1969) també van correlacionar la presència de conidis pigmentats amb la virulència a ratolins. Les soques amb conidis pigmentats produïen infeccions a testicles i cua, en canvi les soques sense conidis pigmentats no causaven lesions als animals, malgrat que el fong es podia recuperar de la melsa dels ratolins un mes després de la inoculació

(Mackinnon *et al.* 1969). Malauradament, en el nostre cas no es van realitzar estudis de recuperació fúngica en òrgans, però les espècies *S. mexicana* i *S. globosa* productores de conidis pigmentats no van ocasionar cap tipus de lesió aparent als ratolins el que ens indica que no totes les espècies pigmentades del complex són patògenes. Caldrà però realitzar estudis més extensos i amb més soques per a poder confirmar tots aquests resultats.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

FILOGÈNIA MOLECULAR I CARACTERITZACIÓ FENOTÍPICA DEL COMPLEX D'ESPÈCIES DE
SPOROTHRIX SCHENCKII

Rita Marimón Picó

ISBN: 978-84-691-1554-1 /DL:T.147-2008

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
FILOGÈNIA MOLECULAR I CARACTERITZACIÓ FENOTÍPICA DEL COMPLEX D'ESPÈCIES DE
SPOROTHRIX SCHENCKII
Rita Marimón Picó
ISBN: 978-84-691-1554-1 /DL:T.147-2008

6. CONCLUSIONS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

FILOGÈNIA MOLECULAR I CARACTERITZACIÓ FENOTÍPICA DEL COMPLEX D'ESPÈCIES DE
SPOROTHRIX SCHENCKII

Rita Marimón Picó

ISBN: 978-84-691-1554-1 /DL:T.147-2008

6. CONCLUSIONS

1. L'anàlisi multigènic preliminar, aplicat a un total de 60 soques de diferents orígens, ha demostrat que *S. schenckii* constitueix un complex d'espècies críptiques, resultant el gen de la calmodulina el marcador genètic més informatiu per a l'anàlisi filogenètic del complex.
2. *Sporothrix schenckii sensu lato*, en base a un estudi de les seqüències del gen de la calmodulina de 142 soques, tant d'origen clínic com ambiental, es distribueix en 6 llinatges principals, 4 dels quals agrupen soques quasi exclusivament d'origen clínic i 2 soques d'origen ambiental.
3. En l'estudi filogenètic, les soques d'origen clínic s'agrupen pel seu origen geogràfic, distingint clarament les que són d'origen americà de les procedents d'Europa o Àsia. En canvi, no s'ha trobat cap correlació entre els *clades* obtinguts i els diferents tipus d'infecció.
4. Dels diferents caràcters fenotípics estudiats, s'ha comprovat que la presència/absència i la morfologia dels conidis sèssils pigmentats, el creixement a 30/37°C i l'assimilació de sacarosa, rafinosa i ribitol són els marcadors més eficaços per a diferenciar la majoria d'espècies del complex d'*S. schenckii*.
5. La combinació d'estudis moleculars i fenotípics ens ha permès:
 - 5.1 Descriure a *S. brasiliensis*, *S. globosa* i a *S. mexicana* com a noves espècies per a la ciència.

- 5.2 Demostrar que *S. schenckii* var. *luriei* i *S. albicans* són espècies diferents a *S. schenckii* i proposar a la primera com la nova espècie, *S. luriei*.
6. Les diferents espècies que integren el complex *S. schenckii* presenten diferent sensibilitat *in vitro* als antifúngics, essent *S. mexicana* la més resistent i *S. brasiliensis* la més sensible.
7. L'antifúngic més actiu en front de la majoria d'espècies d'*Sporothrix* és la terbinafina seguit del ketoconazol i el posaconazol.
8. L'estudi de patogenicitat en ratolins ha posat de manifest que *S. brasiliensis* i *S. schenckii* són les espècies més virulentes del complex, causant infecció sistèmica amb un 100% de mortalitat. Per altra banda, *S. globosa*, *S. mexicana* i *S. albicans* no varen causar cap tipus de manifestació clínica evident.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
FILOGÈNIA MOLECULAR I CARACTERITZACIÓ FENOTÍPICA DEL COMPLEX D'ESPÈCIES DE
SPOROTHRIX SCHENCKII
Rita Marimón Picó
ISBN: 978-84-691-1554-1 /DL:T.147-2008

7. BIBLIOGRAFIA

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

FILOGÈNIA MOLECULAR I CARACTERITZACIÓ FENOTÍPICA DEL COMPLEX D'ESPÈCIES DE
SPOROTHRIX SCHENCKII

Rita Marimón Picó

ISBN: 978-84-691-1554-1 /DL:T.147-2008

7. BIBLIOGRAFIA

Ajello, L. i Kaplan W. 1969. A new variant of *Sporothrix schenckii*.
Mykosen **12**:633-644.

Alberici, F., Paties C.T., Lombardi G., Ajello L., Kaufman L. i Chandler F. 1989. *Sporothrix schenckii* var. *luriei* as the cause of sporotrichosis in Italy. Eur. J. Epidemiol. **5**:173-177.

Alvarado-Ramirez, E. i Torres-Rodriguez, J.M. 2007. In vitro susceptibility of *Sporothrix schenckii* to six antifungal agents using three different methods. Antimicrob. Agents Chemother **60**:658-661.

Ansel, M. i Thibaut, M. 1970. Une nouvelle Endomycetaceae: *Dolichoascus* nov. Gen. Découverte de la reproduction sexuée par asques chez *Sporotrichum schenckii* (Hektoen et Perkins, 1900). C.r. hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris **270**:2171-2173.

Barnet, H.L., Beneke, E.S., Emerson, R., Farr, M.L., Gray, W.D., Korf, R.P., Simmons, E.G. i Stevens, R.B. (Stevens, R.B. ed.) 1974. Mycology guidebook. University of Washington Press, Seattle and London.

Baroni, A., Palla, M., Iovene, M.R., Faccenda, F., Aiello, F.S., Puca, R.V. i Satriano, R.A. 2007. Sporotrichosis: success of itraconazole treatment. Skinmed. **6**:41-44.

Barros, M.B.L., Schubach, T.M., Galhardo, M.C., de Oliveira Schubach, A., Monteiro, P.C., Reis, R.S., Zancope-Oliveira, R.M., dos Santos Lazera, M., Cuzzi-Maya, T., Blanco, T.C., Marzochi, K.B., Wanke, B. i do Valle, A.C. 2001. Sporotrichosis: an emergent zoonosis in Rio de Janeiro. Mem. Inst. Oswaldo Cruz **96**: 777-779.

Barros, M.B.L., Schubach, A.O., Galhardo, M.C., Schubach, T.M.P., Reis, R.S., Conceição, M.J. i Valle, A.C. 2003. Sporotrichosis with widespread lesions - a report of 24 cases related to transmission by domestic cats in Rio de Janeiro, Brazil. *Int. J. Dermatol.* **42**: 677-681.

Barros, M.B., Schubach, A. de O., do Valle, A.C., Gutierrez Galhardo, M.C., Conceição-Silva, F., Schubach, T.M., Reis, R.S., Wanke, B., Marzochi, K.B. i Conceição, M.J. 2004. Cat-transmitted sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil: description of a series of cases. *Clin. Infect. Dis.* **38**:529-535.

Beard, C.B., Carter, J.L., Keely, S.P., Huang, L., Pieniazek, N.J., Moura, I.N., Roberts, J.M., Hightower, A.W., Bens, M.S., Freeman, A.R., Lee, S., Stringer, J.R., Duchin, J.S., del Rio, C., Rimland, D., Baughman, R.P., Levy, D.A., Dietz, V.J., Simon, P. i Navin, T.R. 2000. Genetic variation in *Pneumocystis carinii* isolates from different geographic regions: implications for transmission. *Emerg. Infect. Dis.* **6**:265-272.

Berbee, M.L. i Taylor, J.W. 1992 18S Ribosomal RNA gene sequence characters place the human pathogen *Sporothrix schenckii* in the genus *Ophiostoma*. *Exp Mycol* **16**:87-91.

Berbee, M.L. i Taylor, J.W. 1999. Fungal phylogeny. p. 21-77. A: RP. Oliver i M. Schweizer (ed), *Molecular Fungal Biology*. Cambridge University Press. UK.

Berbee, M.L. i Taylor, J.W. 2001. Fungal molecular Evolution: Gene trees and geologic time. A: The Mycota VII. Part B. Syatematics and Evolution. McLaughlin I Lemke ed.: 229-245. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.

Bills, G.F., Polishook, J.D., Goetz, M.A., Sullivan, R.F. i White, J.F.Jr. 2002. *Chaunopycnis pustulata* sp. nov., a new Clavicipitalean anamorph

producing metabolites that modulate potassium ion channels. Mycol. Prog. **1**:3-18.

Bustamante, B. i Campos P.E. 2001. Endemic sporotrichosis. Curr. Opin. Infect. Dis. **14**: 145-149.

Bustamante, B. i Campos P.E. 2004. Sporotrichosis: a forgotten disease in the drug research agenda. Expert Rev. Anti. Infect. Ther. **2**:85-94.

Campos, P., Arenas, R. i Coronado, H. 1994. Epidemic cutaneous sporotrichosis. Int. J. Dermatol. **33**: 38-41.

Cano, J. Solé, M. Pitarch, L.B. i Guarro, J. 2002. *Castanedomyces australiensis* gen.nov. sp.nov. A keratinophilic fungus from Australian soil. Stud. Mycol. **47**:165-172.

Carbone, I. i Kohn L.M. 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. Mycologia **91**:553-556.

Carlile, M.J. i Watkinson, S. 1994. The Fungi. Academic Press, London, United Kingdom.

Carmichael, J.W. 1962. *Chrysosporium* and some other aleurisporic hyphomycetes. Can. J. Bot. **40**:1137-1173.

Centers for Disease Control. 1988. Multistate outbreak of sporotrichosis in seedling handlers. Morb. Mortal Wkly. Rep. **37**: 652-653.

Chakrabarti, A., Roy, S.K., Dhar, S. i Kumar, B. 1994. Sporotrichosis in north-west India. Indian J. Med. Res. **100**: 62-65.

Conti-Diaz, I.A. 1980. Sporotrichosis in Uruguay: Epidemiologic and clinical aspects. A: (Ed), Pan American Health Organization Scientific Publication, Washington DC: Pan American Health Organization, p. 312-321.

Conti, I.A., Civila, E. i Gezuele, E. 1992. Treatment of human cutaneous sporotrichosis with itraconazole. *Mycoses* **35**:153-156.

Cooper, C.R., Dixon, D.M. i Salkin, I.F. 1992. Laboratory-acquired sporotrichosis. *J. Med. Vet. Mycol.* **30**: 169-171.

Cracraft, J. 1983. Species concepts and speciation analysis. A: Current Ornithology, Vol 1, pp 159-187. Plenum Press, New York.

Cunningham, C. 1997. Can three incongruences tests predict when data should be combined? *Mol. Biol. Evol.* **14**:733-740.

Czelusniak, J., Goodman, M., Monnief, N.D. i Kehobe, S.M. 1990. Maximum parsimony approach to construction of evolutionary trees from aligned homologous sequences. *Methods Enzymol.* **183**:601-615.

Darwin, C. 1859. On the origin of species by means of natural selection. Murray, London.

De Beer, Z., Harrington T.C., Vismer H.F., Wingfield B.D. i Wingfield M.J. 2003. Phylogeny of the *Ophiostoma stenoceras-Sporothrix schenckii* complex. *Mycologia* 95: 434-441.

DeHart, D.J. 1995. Use of itraconazole for treatment of sporotrichosis involving a knee prosthesis. *Cli. Infect. Dis.* **21**:450.

de Hoog, G.S. 1974. The genera *Blastobotrys*, *Sporothrix*, *Calcarisporium* and *Calcarisporiella* gen. nov. *Stud. Mycol.* **7**:1-84.

de Hoog, G.S., Guarro, J., Gené, J. i Figueras, M.J. 2000. Atlas of clinical fungi. 2nd. ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands, University Rovira i Virgili, Reus, Spain.

de Hoog, G.S., Marvin-Sikkema F.D., Lahpoor G.A., Gottschall J.C., Prins, R.A. i Guého, E. 1994. Ecology and physiology of the emerging opportunistic fungi *Pseudallescheria boydii* and *Scedosporium prolificans*. Mycoses 37:71-78.

DeSalle, R., Wray, C. i Asbher, R. 1994. Computational problems in molecular systematics. A: *Molecular Ecology and Evolution: Approaches and Applications*. Ed. B. Schierwater, B. Streit, G. P. Wagner, i R. Dessalle, Basell: Birkhäudser Verlag Basel.

Dixon, D.M., Duncan, R.A. i Hurd, N.J. 1992. Use of a mouse model to evaluate clinical and environmental isolates of *Sporothrix* spp. from the largest U.S. epidemic of sporotrichosis. J Clin Microbiol. **30**:951-954.

Dixon, D.M., Salkin, I.F., Duncan, R.A., Hurd, N.J., Haines, J.H., Kemna, M.E., i Coles, F.B. 1991. Isolation and characterization of *Sporothrix schenckii* from clinical and environmental sources associated with the largest U.S. epidemic of sporotrichosis. J. Clin. Microbiol. **29**:1106-1113.

Dobzhansky, T. Genetics and the Origin of Species. Columbia University Press, New York. 3rd ed., 1951.

Donabedian, H., O'Donnell, E., Olszewski, C., Macarthur, R.D. i Budd, N. 1994. Disseminated cutaneous and meningeal sporotrichosis in an AIDS patient. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. **18**: 111-115.

Dunstan, R.W., Langham, R.F., Reimann, K.A. i Wakenell, P.S. 1986a. Feline sporotrichosis: a report of five cases with transmission to humans. J. Am. Acad. Dermatol. 15: 37-45.

Dunstan, R.W., Reimann, K.A. i Langham, R.F. 1986b. Feline sporotrichosis. J. Am. Vet. Med. Assoc. 189: 880-883.

Eisfelder, M., Okamoto, S. i Toyama, K. 1993. Experience with 241 sporotrichosis cases in Chiba, Japan. Hautarzt **44**: 524-528.

Elewski, B.E. 1998. Onychomycosis: pathogenesis, diagnosis, and management. Clin. Microbiol. Rev. **11**:415-429.

Espinel-Ingroff, A. 1994. La estandarización de las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos y métodos alternativos. Rev. Esp. Quimioter. **7**:20-31.

Espinel-Ingroff, A., Boyle, K. i Sheehan, D.J. 2001. In vitro antifungal activities of voriconazole and reference agents as determined by NCCLS methods: review of the literature. Mycopathologia. **150**:101-15.

Espinel-Ingroff, A. i Shadomy, S. 1989. In vitro and in vivo evaluation of antifungal agents. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **8**:352-361.

Feldestein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution **39**:783-791.

Fernandes, K.S., Mathews, H.L. i Lopes Bezerra, L.M. 1999. Differences in virulence of *Sporothrix schenckii* conidia related to culture conditions and cell-wall components. J. Med. Microbiol. **48**:195-203.

Ferreti de Lima, R., Vidal Schäffer, G. i de Moraes Borba, C. 2003. Variants of *Sporothrix schenckii* with attenuated virulence for mice. *Microbes Infect.* **5**: 933-938.

Fischman, O., Alchorne, M.M. i Portugal, M.A. 1973. Human sporotrichosis following rat bite. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* **15**: 99-102.

Fukushiro, R. 1984. Epidemiology and ecology of sporotrichosis in Japan. *Zentralbl. Bakteriол. Mikrobiol. Hyg.* **257**: 228-233.

García, D., Stchigel, A.M., Cano, J., Guarro, J i Hawksworth, D.L.. 2004. A synopsis and recircumscription of *Neurospora* (syn. *Gelasinospora*) based on ultrastructural and 28S rDNA sequence data. *Mycol. Res.* **108**:1119-11142.

Gené, J., Guillamón, J.M., Guarro, J., Pujol, I. i Ulfig K. 1996. *Hormographiella aspergillata* anamorph of *Coprinus cinereus*, a human opportunistic fungus: molecular characterization and antifungal susceptibility. *Anton. Leeuw. Int. J. G.* **70**:49-57.

Ghosh, A., Maity, P.K., Hemashettar, B.M., Sharma, V.K. i Chakrabarti, A. 2002. Physiological characters of *Sporothrix schenckii* isolates. *Mycoses* **45**:449-454.

Gilgado, F., Cano, J., Gené, J. i Guarro, J. 2005. Molecular phylogeny of the *Pseudallescheria boydii* species complex: proposal of two new species. *J. Clin. Microbiol.* **43**:4930-4942.

Glass, N. i Donaldson G. 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:1323-1330.

Gonzalez, G.M., Fothergill, A.W., Sutton, D.A., Rinaldi, M.G. i Loebenberg, D. 2005. In vitro activities of new and established triazoles against opportunistic filamentous and dimorphic fungi. *Med. Mycol.* **43**:281-284.

González-Ochoa, A. 1965. Contribuciones recientes al conocimiento de la esporotrichosis. *Gac. Med. Mex.* **95**: 463-474.

Guarro, J. Gene, J. i Stchigel, A. 1999. Development in fungal taxonomy. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**:454-500.

Haidle, C.W. i Storck, R. 1966. Control of dimorphism in *Mucor rouxii*. *J. Bacteriol.* **92**:1236-1244.

Hawksworth, D.L., Kirk, P.M., Sutton, B.C. i Pegler, D.N. 1995. Ainsworth & Bisby's dictionary of the Fungi. CAB International, Wallingford, UK.

Hektoen, L. i Perkins, C.F. 1900. Refractory subcutaneous abscesses caused by *Sporothrix schenckii*. A new pathogenic fungus. *J. Exp. Med.* **5**: 77-89.

Hennekin, C., Abachi, E., Symoens, F., Lavarde, V., Reboux, G. Nolard, N. i Berche, P. 1999. Identification of *Fusarium* species involved in human infections by 28S rRNA gene sequencing. *J. Clin. Microbiol.* **37**:3586-3589.

Henrion, B. Chevalier, G. I Martin, F. 1994. Typing truffle species by PCR amplification of the ribosomal DNA spacers. *Mycol. Res.* **98**:37-43

Hillis, D.M. i Bull, J.J. 1993. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Syst. Biol.* **42**:182-192.

Howard, D.H. 1961. Dimorphism of *Sporotrichum schenckii*. J. Bacteriol. **81**:464-469.

Howard, D.H. i Orr, G.F. 1963. Comparison of strains of *Sporotrichum schenckii* isolated from nature. J. Bacteriol. **85**:816-821.

Hull, P.R. i Vismer, H.F. 1992. Treatment of cutaneous sporotrichosis with terbinafine. British J. Dermatol. 126 (Suppl.) **39**: 51-52.

Huzefa, A.R., Campbell, J. i Sheaner, C.A. 2003. Freshwater ascomycetes: *Cyanoannulus petersenii*, a new genus and species from submerges wood. Mycotaxon **88**:1-17.

Itoh, M., Okamoto, S. i Kariya, H. 1986. Survey of 200 cases of sporotrichosis. Dermatologica **172**: 209-213.

Ishizaki, H. 2003. Mitochondrial DNA analysis of *Sporothrix schenckii*. Jpn. J. Med. Mycol. **44**:155-157.

Ishizaki, H., Kawasaki, M., Aoki, M., Matsumoto, T., Padhye, A.A., Mendoza, M. i Negróni, R. 1998. Mitochondrial DNA analysis of *Sporothrix schenckii* in North and South America. Mycopathologia **142**:115-118.

Ishizaki, H., Kawasaki, M., Aoki, M., Wu, S., Lin, J., Kim, J.A., Won, Y.H., i Calvo, C.R. 2004. Mitochondrial DNA analysis of *Sporothrix schenckii* from China, Korea and Spain. Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi **45**:23-25.

Ishizaki, H., Kawasaki, M., Mochizuki, M.T., Jin, X.Z., i Kagawa, S. 2002. Environmental isolates of *Sporothrix schenckii* in China. Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi **43**:257-260.

Johnson, E.M., Szekely, A., i Warnock, D.W. 1998. In-vitro activity of voriconazole, itraconazole and amphotericin B against filamentous fungi. J. Antimicrob. Chemother. **42**:741-745.

Kauffman, C.A. 1995. Old and new therapies for sporotrichosis. Clin. Infect. Dis. **21**: 981-985.

Kauffman, C.A. 1999. Sporotrichosis. Clin. Infect. Dis. **29**: 231-236; quiz 237.

Kauffman, C.A., Hajjeh, R. i Chapman, S.W. 2000. Practice guidelines for the management of patients with sporotrichosis. For the Mycoses Study Group. Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis **30**:684 - 687.

Kauffman, C.A., Pappas, P.G., McKinsey, D.S., Greenfield, R.A., Perfect, J.R., Cloud, G.A., Thomas, C.J. i Dismukes, W.E. 1996. Treatment of lymphocutaneous and visceral sporotrichosis with fluconazole. Clin. Infect. Dis. **22**:46-50.

Kerridge, D. i Vanden-Bossche, H. 1990. Drug discovery: a biochemist approach. A: Handbook of experimental pharmacology. Chemotherapy of fungal diseases. Ed: Ryley JF. Berlin-Heidelberg, Springer Verlag.

Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J. Mol. Evol. **16**:111-120.

Kirk, P.M., Cannon, P.F., David, J.C. i Stalpers, J.A. 2001. Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi, 9th edició. CAB International, Wallingford.

Kishino, H. i Hasegawa, H. 1989. Evaluation of the maximum likelihood estimate of the evolutionary tree topologies from DNA sequence data, and the branching order in *Hominoidea*. J. Mol. Evol. **29**:170- 179.

Kohler, L.M., Soares, B.M., de Assis Santos, D., Da Silva Barros, M.E. i Hamdan, J.S. 2006. In vitro susceptibility of isolates of *Sporothrix schenckii* to amphotericin B, itraconazole, and terbinafine: comparison of yeast and mycelial forms. Can. J. Microbiol. **52**:843-847.

Kong, X., Xiao, T., Lin, J., Wang, Y. i Chen, H.D. 2006. Relationships among genotypes, virulence and clinical forms of *Sporothrix schenckii* infection. Clin. Microbiol. Infect. **12**:1077-81.

Kornerup, A. i Wanscher J.H. 1984. Methuen handbook of colour, 3 ed. 252 p Erye Merhuen, London.

Koufopanou, V., Burt, A., Szaro, T. i Taylor, J.W. 2001. Gene genealogies, cryptic species and molecular evolution in the human pathogen *Coccidioides immitis* and relatives (Ascomycota, Onygenales). Mol. Biol. Evol. **18**:1246-1258.

Kwan, S.K. i Hack, S. 2002. Three nonorthologous ITS1 types are present in a polypore fungus *Trichaptum abietinum*. Mol. Phylogenet. Evol. **23**:112-122.

Kumar, S. 1996. A stepwise algorithm for finding minimum evolution trees. Mol. Biol. Evol. **13**:584-93.

Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I. B. i Nei, M. 2001. MEGA. Molecular evolutionary genetic analysis v.2.1. Analysis software. Bioinformatics **17**: 244-245.

Kusuhara, M., Hachisuka, H. i Sakai, Y. 1988. Statistical survey of 150 cases with Sporotrichosis. *Mycopathologia* **102**: 129-133.

Kwon-Chung, K. i Bennett, J. 1992. Sporotrichosis p. 707-729. A: Kwon-Chung, K. Et al. (Eds), ,Medical Mycology, Philadelphia: Lea & Febiger.

Lacaz, C.S. 1998. *Sporothrix schenckii* p. 326-331. A: Lacaz C.S. et al. (Eds), Guia para identificaçao: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico. Sao Paulo: Sarvier.

Larsson, C.E., Goncalves, M.A., Araujo, V.C., Dagli, M.L., Correa, B. i Fava Neto C. 1989. Feline sporotrichosis: clinical and zoonotic aspects. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo. **31**: 351-358.

Leshner, J.L., Fitch, M.H. i Dunlap, D.B. 1994. Subclinical hypothyroidism during potassium iodidetherapy for lymphocutaneous sporotrichosis. *Cutis* **53**: 128-130.

Linnaeus, C. 1758. Systema Naturae, 10th ed. Stockholm.

Liu, Y.J., Whelen, S. i Hall, B.D. 1999. Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from RNA polymerase II subunit. *Mol. Biol. Evol.* **16**:1799-1809.

Lopes, J.O., Alves, S.H., Mari, C.R., Brum, L.M., Westphalen, J.B., Altermann, M.J. i Prates, F.B. 1999. Epidemiology of sporotrichosis in the central region of Rio Grande do Sul. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **32**: 541-545.

Lopes-Bezerra, L.M., Schubach, A., Costa, R.O. 2006. *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. *An. Acad. Bras. Cienc.* **78**:293-308.

Lortholary, O., Denning, D.W. i Dupont, B. 1999. Endemic mycoses: a treatment update. *J. Antimicrob. Chemother.* **43**:321-331.

Lutz, A. i Splendore, A. 1907. Sobre uma mycose observada em homens e ratos. *Rev. Med. Sao Paulo* **21**:433-450.

Lutzoni, F., Kauff, F., Cox, C.J., McLaughlin, D., Celio, G., Dentinger, B., Padamsee, M., Hibbett, D., James, T.Y., Baloch, E., Grube, M., Reeb, V., Hofstetter, V., Schoch C., Arnold, A.E., Miadlikowska, J., Spatafora, J., Johnson, D., Hambleton, s., Crockett, M., Shoemaker, R., Sung, Gi-Ho, Lücking, R., Lumbsch, T., O'Donnell, K., Binder, M., Diederich, P., Ertz, D., Gueidan, C., Hansen, K., Harris, R.C., Hosaka, K., Lim, Y., Matheny, B., Nishida, H., Pfister, D., Rogers, J., Rossman, A., Schmitt, I., Sipman, H., Stone, J., Sugiyama, J., Yahr, R. i Vilgalys, R. 2004. Assembling the fungal tree of life: progress, classification, and evolution of subcellular traits. *Am. J. Bot.* **91**:1446-1480.

Lyon, G.M., Zurita, S., Casquero, J., Holgado, W., Guevara, J., Brandt, M.E., Douglas, S., Shutt, K., Warnock, D.W. i Hajjeh, R.A. 2003. Population-based surveillance and a case-control study of risk factors for endemic lymphocutaneous sporotrichosis in Peru. *Clin. Infect. Dis.* **36**: 34-39.

Mackinnon, J.E. 1970. Ecology and epidemiology of sporotrichosis, p. 169-181. A: *Proceedings of the International Symposium on Mycoses*. Pan American Health Organization, Washington, D. C.

Mackinnon, J. i Conti-Diaz, I. 1962. The effect of temperature on sporotrichosis. *Sabouradia* **2**:56-59.

Mackinnon, J., Conti-Diaz, I., Gezuele, E., Civila, E. i da Luz, S. 1969. Isolation of *Sporothrix schenckii* from nature and considerations on its pathogenicity and ecology. *Sabouraudia* **7**: 38-45.

Mackinnon, J., Conti-Diaz, I. i Yarzabal, L.A. 1964. Experimental sporotrichosis, ambient temperature and amphotericin B. *sabouradia* **3**:192-194.

Mariat, F. 1971a. Adaptation de *Ceratocystis* à la vie parasitaire chez l'animal. Étude de l'aquisition d'un pouvoir pathogène comparable à celui de *Sporothrix schenckii*. *Sabouradia* **16**: 185-198.

Mariat, F. 1971b. Adaptation de *Ceratocystis stenoceras* (Robak) C. Moreau à la vie parasitaire chez l'animal Etude de la souche sauvage et des mutants pathogènes. Comparaison avec *Sporothrix schenckii* Hektoen et Perkins. *Rev. Mycol.* **36**:3-25.

Mariat, F. i Diez, E. 1971. Nature des spores endogènes de *Sporothrix schenckii* Hektoen et Perkins. Remarques à propos de l'éventuelle forme sexuée de ce champignon. C. r. hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris **272**:1075-1077.

Mariat, F., Escudié, A. i Gaxotte, P. 1968 Isolement de souches de *Ceratocystis* sp. À forme conidienne *Sporotrichum*, se cultive sur peaux humaines et de poils de rats. Comparaison avec l'espèce pathogène *Sporotrichum schenckii*. *CR. Hebd. Acad. Sci., Paris* **267**:974-976.

Mariat, F., Lavalley, P. i Destombes, P. 1962. Recherches sur la Sporotrichose. Etude mycologique et pouvoir pathogene de souches Mexicaines de *Sporotrichum schenckii*. *Sabouraudia* **2**:60-79.

Marimon, R., Cano, J., Gené, J., Sutton, D.A., Kawasaki, M. i Guarro, J. 2007. *S. brasiliensis*, *S. globosa* and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* species of clinical interest:. J. Clin. Microbiol. En prensa.

Marimon, R., Gené, J., Cano, J., Trilles, L., Dos Santos Lazera, M. i Guarro J. 2006. Molecular phylogeny of *Sporothrix schenckii*. J. Clin. Microbiol. **44**:3251–3256.

Mayrn, E. 1942. Systematics and the Origin of Species. Columbia University Press. New York.

McGinnis, M.R., Nordoff, N., Li, R.K., Pasarell, L. i Warnock, D.W. 2001. *Sporothrix schenckii* sensitivity to voriconazole, itraconazole and amphotericin B. Med. Mycol. **39**:369-371.

Mendonça-Hagler, L.C., Travassos, L.R., Lloyd, K.O. i Phaff, H.J. 1974 Deoxyribonucleic acid base composition and hybridization studies on the human pathogen *Sporothrix schenckii* and *Ceratocystis* species. Infect Immun **9**:934-938.

Mercadal-Peyrí, J., Bassas-Grau, M., Sans-Macaró, J., De Martín-Gassó, C., i Mercadal-Peyrí, J.O. 1965. Two very rare clinical diseases in our climate: cutaneous actinomycoses and blastomycosis of a vegetating type. Mycopathol. Mycol. Appl. **27**:68-74.

Mesa-Arango, A.C., Del Rocío Reyes-Montes, M., Pérez-Mejía, A., Navarro-Barranco, H., Souza, V., Zúñiga, G. i Toriello, C. 2002. Phenotyping and genotyping of *Sporothrix schenckii* isolates according to geographic origin and clinical form of sporotrichosis. J. Clin. Microbiol. **40**:3004-3011.

Moore, J. i Davis, D. 1918. Sporotrichosis following mouse bite with certain immunologic data. J. Infect. Dis. 23: 252-265.

Morris-Jones, R., Youngchim, S., Gomez, B.L., Aisen, P., Ray, R.J., Nosanchuk, J.D., Casadevall, A. i Hamilton, A.J. 2003. Synthesis of melanin-like pigments by *Sporothrix schenckii* in vitro and during mammalian infection. Infect. Immun. **71**: 4026-4033.

Mostert, L., Crous, P.W., Groenewald, J.Z., Gams, W. i Summerbell, R. 2003. *Togninia* (*Calosphaeriales*) is confirmed as teleomorph of *Phaeoacremonium* by means of morphology, sexual compatibility, and DNA phylogeny. Mycologia **95**:646-659.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2002. References method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard M38-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.

Neyra, E., Fonteyne, P., Swinne, D., Fauche, F., Bustamante, B. i Nolard, N. 2005. Epidemiology of human sporotrichosis investigated by amplified fragment length polymorphism. J. Clin. Microbiol. **43**:1348-1352.

Nicot, J. i Mariat, F. 1973. Caractères morphologiques et position systématique de *Sporothrix schenckii*, agent de la sporotrichose humaine. Mycopath. Mycol. Appl. **49**:53-65.

Nobre, M. de O., Antunes, T. de A., de Faria, R.O., Cleff, M.B., Fernández, C.G., Muschner, A.C., Meireles, M.C. i Ferreira, L. 2005. Differences in virulence between isolates of feline Sporotrichosis. Mycopathologia. **160**:43-49.

O'Donnell, K. 1993. *Fusarium* and its near relatives, pp 225-233. A: The fungal holomorph: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics. Reynolds, R. I Taylor, J. W. ed. CBA International, Wallingford.

O'Donnell, K., Cigelnik, E. i Nirenberg, H.I. 1998. Molecular systematics and phytogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia* **90**:465-493.

O'Donnell, K., Sarver, B.A., Brandt, M., Chang, D.C., Noble-Wang, J., Park, B.J., Sutton, D.A., Benjamin, L., Lindsley, M., Padhye, A., Geiser, D.M. i Ward, T.J. 2007. Phylogenetic diversity and microsphere array-based genotyping of human pathogenic fusaria, including isolates from the multistate contact lens-associated U.S. Keratitis outbreaks of 2005 and 2006. *J. Clin. Microbiol.* **45**:2235-2248.

O'Reilly, L.C. i Altman, S.A. 2006. Macrorestriction analysis of clinical and environmental isolates of *Sporothrix schenckii*. *J. Clin. Microbiol.* **44**:2547-2552.

Padhye, A.A., Kaufman, L., Durry, E., Banerjee, C.K., Jindal, S.K., Talwar, P. i Chakrabarti, A. 1992. Fatal pulmonary sporotrichosis caused by *Sporothrix schenckii* var. *luriei* in India. *J. Clin. Microbiol.* **30**:2492-2494.

Panja, D., Dey, N.C. i Ghosh, L.M. 1947. Sporotrichosis of the skin in India. *Indian Med. Gaz.* **82**:200-202.

Pappas, P.G., Tellez, I., Deep, A.E., Nolasco, D., Holgado, W. i Bustamante, B. 2000. Sporotrichosis in Peru: Description of an area of hyperendemicity. *Clin. Infect. Dis.* **30**: 65-70.

Pringle, A., Baker, D.M., Platt, J.L., Wares, J.P., Latgé, J.P. i Taylor, J.W. 2005. Cryptic speciation in the cosmopolitan and clonal human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. *Evolution* **59**:1886-1899.

Quintal, D. 2000. Sporotrichosis infection on mines of the Witwatersand. *J. Cutan. Med. Surg.* **4**: 51-54.

Read, S.I. i Sperling, L.C. 1982. Feline sporotrichosis. Transmission to man. *Arch. Dermatol.* **118**: 429-431.

Reed, K.D., Moore, F.M., Geiger, G.E. i Stemper, M.E. 1993. Zoonotic transmission of sporotrichosis: case report and review. *Clin. Infect. Dis.* **16**: 384-387.

Rippon, J.W. 1988. *Medical Mycology. The Pathogenic Fungi and Pathogenic Actinomycetes*, 3 ed., Philadelphia: WB Saunders Company, p. 325-352.

Rivitti, E.A. i Aoki, V. 1999. Deep fungal infections in tropical countries. *Clin. Dermatol.* **17**:171-190.

Romero-Martinez, R., Wheeler, M., Guerrero-Plata, A. Rico, G. i Torres-Guerrero, H. 2000. Biosynthesis and fuctions of melanin in *Sporothrix schenckii*. *Infect. Immun.* **68**:3696-3703.

Rzhetsky, A. i Nei, M. 1992. Statistical properties of the ordinary least-squares, generalized least-squares, and minimum-evolution methods of phylogenetic inference. *J. Mol. Evol.* **35**:367-75.

Rzhetsky, A. i Nei, M. 1993. Theoretical foundation of the minimum-evolution method of phylogenetic inference. *Mol. Biol. Evol.* **10**:1073-95.

Saitou, N. i Imanishi, T. 1989. Relative efficiencies of the Fitch-Margoliash, maximum-parsimony, maximum-likelihood, minimum-evolution, and neighbour-joining methods of phylogenetic tree construction in obtaining the correct tree. *Mol. Biol. Evol.* **6**: 514-525.

Saitou, N. i Nei M. 1997. The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**:406-425.

Schenck, B.R. 1898. Refractory subcutaneous abscesses caused by a fungus possibly related to the sporotrichia. *Johns Hopkins Hosp. Bull* **9**:286-290.

Schubach, T.M., Schubach, A., dos Reis, R.S., Cuzzi-Maya, T., Blanco, T.C., Monteiro, D.F., Barros, B.M., Brustein, R., Zancope-Oliveira, R.M., Fialho Monteiro, P.C. i Wanke, B. 2002. *Sporothrix schenckii* isolated from domestic cats with and without sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil. *Mycopathologia* **153**: 83-86.

Schubach, T.M. i Schubach, A. 2000. Sporotrichosis of cat and dog - review. *Clin. Vet.* **29**: 21-24.

Schubach, A., Schubach, T.M., Barros, M.B.L. i Wanke, B. 2005. Cat-transmitted sporotrichosis, Rio de Janeiro, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* **11**:1952-1954.

Schubach, T.M., Schubach, A., Cuzzi-Maya, T., Okamoto, T., Reis, R.S., Monteiro, P.C., Gutierrez-Galhardo, M.C. i Wanke, B. 2003. Pathology of sporotrichosis in 10 cats in Rio de Janeiro. *Vet. Rec.* **152**: 172-175.

Schubach, T.M., Schubach, A., Okamoto, T., Barros, M.B., Figueiredo, F.B., Cuzzi, T., Fialho-Monteiro, P.C., Reis, R.S., Perez, M.A. i Wanke,

B. 2004. Evaluation of an epidemic of sporotrichosis in cats: 347 cases (1998-2001). J. Am. Vet. Med. Assoc. **224**:1623-1629.

Schubach, T.M., Schubach, A., Okamoto, T., Barros, M.B., Figueiredo, F.B., Cuzzi, T., Pereira, S.A., Dos Santos, I.B., Almeida Paes, R., Paes Leme, L.R. i Wanke, B. 2006. Canine sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: clinical presentation, laboratory diagnosis and therapeutic response in 44 cases (1998-2003). Med. Mycol. **44**: 87-92.

Shadomy, S., Espinel-Ingroff, A. i Cartwright, R.Y. 1991. Laboratory studies with antifungal agents: susceptibility tests and bioassays. A: Manual of clinical Microbiology, 4th ed. Eds: Lennette, E.H., Balows, A., Hausler, W.J., Shadomy, H.J. American Society for Microbiology, Washington CD.

Shadomy, S. i Shadomy, H.J. 1991. Comparative in vitro antifungal susceptibility studies with 30 serotype A and B isolates of *Candida albicans*. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. **14**:21-22.

Sharkey-Mathis, P.K., Kauffman, C.A., Graybill, J.R., Stevens, D.A., Hostetler, J.S., Cloud, G. i Dismukes, W.E. 1993. Treatment of sporotrichosis with itraconazole. Am. J. Med. **95**:279-285.

Shaw, J.C., Levinson, W. i Montanaro, A. 1989. Sporotrichosis in the acquired immunodeficiency syndrome. J. Acad. Am. Dermatol. **21**: 1145-1147.

Steadham, J.E., Geis, P.A. i Simmonak, J.L. 1986. Use of carbohydrate and nitrate assimilation in the identification of dematiaceous fungi. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. **5**: 71-75.

Sterling, J.B. i Heymann, W.R. 2000. Potassium iodide in dermatology: A 19 century drug for the 21 century - uses, pharmacology, adverse effects, and contraindications. *J. Am. Acad. Dermatol.* **43**: 691-697.

Suh, S.O. i Blackwell, M. 1999. Molecular phylogeny of the cleistothecial fungi placed in *Cephalothecaceae* and *Pseudeurotiaceae*. *Mycologia* **91**:836-848.

Summerbell, R.C., Kane, J., Krajden, S. i Duke, E.E. 1993. Medically important *Sporothrix* species and related ophiostomatoid fungi pp 185-192. A: Wingfield MJ, Seifert KA, Webber, JF, eds. *Ceratocystis* and *Ophiostoma*: taxonomy, ecology and pathogenicity. St. Paul, Minnesota: American Phytopathological Society.

Suzuki, K., Kawasaki, M. i Ishizaki, H. 1988 Analysis of restriction profiles of mitochondrial DNA from *Sporothrix schenckii* and related fungi. *Mycopathologia* **103**:147-151.

Swofford, D.L. 2001. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). (Version 4.0) Sinauer Associates, Sunderland, MA.

Swofford, D.L. i Olsen, G. J. 1990. Phylogeny reconstruction. A: Molecular Systematics. Hillis, D.M. i Moritz, C., ed.: 411-501. Sinauer Associates; Sunderland, Massachusetts.

Tachibana, T., Matsuyama, T., Ito, M. i Mitsuyama, M. 2001. *Sporothrix schenckii* thermo-intolerant mutants losing fatal visceral infectivity but retaining high cutaneous infectivity. *Med. Mycol.* **39**:295-298.

Tavanti, A., Davidson, A.D., Gow, N.A.R. i Maiden, M.C.J. 2005. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *J. Clin. Microbiol.* **43**:284-292.

Taylor, J.J. 1970. A comparison of some *Ceratocystis* species with *Sporothrix schenckii*. Mycopathol. Mycol. Appl. **42**:233-240.

Tehler, A., Farris, J.S., Lipscomb, D.L. i Källersjö, M. 2000. Phylogenetic analyses of the fungi based on the large rDNA data sets. Mycologia **92**:459-474.

Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. i Higgins, D.G. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res. **24**:4876-4882.

Thompson, D.W. i Kaplan, W. 1977. Laboratory-acquired sporotrichosis. Sabouraudia **15**: 167-170.

Travassos, L.R., Gorin, P.A.J. i Lloyd, K.O. 1974 Discrimination between *Sporothrix schenckii* and *Ceratocystis stenoceras* rhamnomannans by proton and carbon-13 magnetic resonance spectroscopy. Infect Immun **9**:674-680.

Travassos, L. R., i Lloyd, K.O. 1980. *Sporothrix schenckii* and related species of *Ceratocystis*. Microbiol. Rev. **44**:683-721.

Trilles, L., Fernandez-Torres, B., Dos Santos Lazera, M., Wanke, B., de Oliveira Schubach, A., de Almeida Paes, R., Inza, I. i Guarro, J. 2005. In vitro antifungal susceptibilities of *Sporothrix schenckii* in two growth phases. Antimicrob. Agents Chemother. **49**:3952-3954.

Vandamme, A.M. 2003. Basic concepts of molecular evolution, pp.1-23. A: M. Salemi i A.M. Vandamme (ed.), The phylogenetic Handbook. A practical approach to DNA and protein phylogeny. 1st ed. Cambridge University press, Cambridge, UK.

Vieira-Dias, D., Sena, C.M., Oréface, F., Tanure, M.A.G. i Hamdan, J.S. 1997. Ocular and concomitant cutaneous sporotrichosis. *Mycoses* **40**: 197-201.

Vismer, H.F. i Hull, P.R. 1997. Prevalence, epidemiology and geographical distribution of *Sporothrix schenckii* infections in Gauteng, South Africa. *Mycopathologia* **137**: 137-143.

Watanabe, S., Kawasaki, M., Mochizuki, T. i Ishizaki, H. 2004. RFLP analysis of the internal transcriber spacer regions of *Sporothrix schenckii*. *Jp. J. Med. Mycol.* **45**:165-175.

White, T.J., Bruns, T.D., Lee, S. i Taylor, J.W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. pp. 315-322. A: M.A. Innis, D.H. Gelfand, J. Sninsky and T.J. White, Editors, PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications, Academic Press, San Diego.

Yarrow, D. 1998. Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts, pp. 95-96. A: C. P. Kurtzman, and J. W. Fell (ed.), The yeasts, a taxonomic study, 4th ed. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.

Zalar, P., de Hoog G.S., Schroers, H.J., Frank, J.M. i Gunde-Cimerman, N. 2005. Taxonomy and phylogeny of the xerophilic genus *Wallemia* (*Wallemiomycetes* and *Wallemiales*, cl. et ord. nov.). *Antonie Van Leeuwenhoek.* **87**:311-328.

Zhang, Z., Liu,X., Yang, G., Gao, X., Jin, L. i An, L. 2006a. Genotyping of *Sporothrix schenckii* by analysis of ribosomal DNA regions.*Mycoses.* **49**:305-10.

Zhang, N., O'Donnell, K., Sutton, D.A., Nalim, F.A., Summerbell, R.C., Padhye, A.A. i Geiser, D.M. 2006b. Members of the *Fusarium solani* species complex that cause infections in both humans and plants are common in the environment. J. Clin. Microbiol. **44**:2186-22190.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
FILOGÈNIA MOLECULAR I CARACTERITZACIÓ FENOTÍPICA DEL COMPLEX D'ESPÈCIES DE
SPOROTHRIX SCHENCKII
Rita Marimón Picó
ISBN: 978-84-691-1554-1 /DL:T.147-2008

ANNEX 1

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

FILOGÈNIA MOLECULAR I CARACTERITZACIÓ FENOTÍPICA DEL COMPLEX D'ESPÈCIES DE
SPOROTHRIX SCHENCKII

Rita Marimón Picó

ISBN: 978-84-691-1554-1 /DL:T.147-2008

Soques inclosos a l'estudi, origen i nº d'accés al EMBL

Aïllat	Origen	nº EMBL		
		CHS	BT2	CAL
IPEC 22543.2	Clínica, esporotricosis disseminada, Brasil	AM117418	AM116948	AM116881
IPEC 15572	Clínica, lesió cutània, Brasil	AM117411	AM116955	AM116886
IPEC 16042	Clínica, lesió cutània, Brasil	AM117416	AM116932	AM116885
IPEC 16243	Clínica, lesió cutània, Brasil	AM117419	AM116957	AM116877
IPEC 16456	Clínica, lesió cutània, Brasil	AM117406	AM116931	AM116897
CBS 120339	Clínica, lesió cutània, Brasil	AM117417	AM116946	AM116899
IPEC 16503	Clínica, lesió cutània, Brasil	AM114894	AM116941	AM116875
IPEC 16550	Clínica, lesió cutània, Brasil	AM114893	AM116953	AM116892
IPEC 16864	Clínica, lesió cutània, Brasil	AM117414	AM116951	AM116889
IPEC 16919	Clínica, lesió cutània, Brasil	AM117407	AM116934	AM116898
IPEC 17307	Clínica, lesió cutània, Brasil	AM117415	AM116949	AM116896
IPEC 17331	Clínica, lesió cutània, Brasil	AM114899	AM116939	AM116880
IPEC 17521	Clínica, lesió cutània, Brasil	AM114895	AM116952	AM116874
IPEC 17585	Clínica, lesió cutània, Brasil	AM114892	AM116940	AM116887
IPEC 17608	Clínica, lesió cutània, Brasil	AM117408	AM116937	AM116890
IPEC 17692	Clínica, lesió cutània, Brasil	AM114897	AM116933	AM159127
IPEC 17786	Clínica, lesió cutània, Brasil	AM114898	AM116954	AM116884
IPEC 17920	Clínica, lesió cutània, Brasil	AM114891	AM116938	AM116888
IPEC 17943	Clínica, líquid cefaloraquidi, Brasil	AM117410	AM116935	AM116878
IPEC 22468	Clínica, sang, Brasil	AM117409	AM116944	AM116882
IPEC 22493.1	Clínica, lesió cutània, Brasil	AM117412	AM116945	AM116894
IPEC 22493.2	Clínica, lesió cutània, Brasil	AM114900	AM116936	AM116883
IPEC 22496.4	Clínica, lesió cutània, Brasil	AM117413	AM116950	AM116895
IPEC 22496.5	Clínica, lesió cutània, Brasil	AM114896	AM116947	AM116879
IPEC 22582	Clínica, biòpsia òssia, Brasil	AM114889	AM116956	AM116891
IPEC 22593	Clínica, esput, Brasil	AM114890	AM116942	AM116893

Soques incloses a l'estudi, origen i nº d'accés al EMBL (Cont.)

Aïllat	Origen	nº EMBL		
		CHS	BT2	CAL
FMR 8337	Ambiental, pòls de casa, Brasil	AM117421	AM116943	AM116876
FMR 9034	Clínica, desconegut, Brasil	AM261684	AM261686	AM261688
FMR 9035	Clínica, desconegut, Brasil	AM261685	AM261687	AM261689
FMR 8604	Clínica, lesió cutània limfàtica, Perú	AM114886	AM116914	AM117429
FMR 8605	Clínica, lesió cutània limfàtica, Perú	AM114869	AM116923	AM117442
FMR 8606	Clínica, lesió cutània limfàtica, Perú	AM114888	AM116913	AM117431
FMR 8607	Clínica, lesió cutània limfàtica, Perú	AM114887	AM116912	AM117428
FMR 8608	Clínica, lesió cutània limfàtica, Perú	AM114879	AM116919	AM117441
FMR 8609	Clínica, lesió cutània limfàtica, Perú	AM114880	AM116918	AM117439
FMR 8677	Clínica, esporotricosis disseminada, Argentina	AM114871	AM116914	AM117436
FMR 8678	Clínica, biòpsia cutània, Argentina	AM114876	AM116920	AM117446
FMR 8679	Clínica, nòdul cutani limfàtic, Argentina	AM114877	AM116922	AM117445
FMR 8716	Clínica, desconegut, Perú	-	-	AM399006
FMR 8717	Clínica, desconegut, Perú	-	-	AM399017
IHEM 3774	Clínica, desconegut, Colòmbia	AM114873	AM116921	AM117447
IHEM 3787	Clínica, desconegut, Sud Àfrica	AM114870	AM116925	AM117435
IHEM 15477	Clínica, nòdul cutani, Bolívia	AM114878	AM116916	AM117444
IHEM 15486	Clínica, desconegut, Perú	AM114882	AM116929	AM117432
IHEM 15489	Clínica, desconegut, Perú	AM114883	AM116926	AM117430
IHEM 15499	Clínica, desconegut, Perú	AM114885	AM116928	AM117434
IHEM 15502	Clínica, desconegut, Perú	AM114884	AM116927	AM117427
IHEM 15503	Clínica, desconegut, Perú	AM114881	AM116930	AM117433
IHEM 15508	Clínica, desconegut, Perú	AM114875	AM116924	AM117443
IHEM 15511	Clínica, desconegut, Perú	AM114874	AM116917	AM117440
CBS 359.36 (Soca tipus S. schenckii)	Desconegut	AM114872	AM116911	AM117437

Soques inclosos a l'estudi, origen i nº d'accés al EMBL (Cont.)

Aïllat	Origen	nº EMBL		
		CHS	BT2	CAL
NBRC 8158	Desconegut	AM117424	AM116967	AM116900
UTHSC 05-2843	Clínica, lesió genoll, EUA	-	-	AM399012
UTHSC 05-802	Clínica, lesió genoll, EUA	-	-	AM399008
UTHSC 04-2235	Clínica, lesió, EUA	-	-	AM398984
UTHSC 04-1718	Clínica, lesió genoll, EUA	-	-	AM398990
UTHSC 04-1064	Clínica, lesió avantbraç, EUA	AM748694	AM747285	AM399014
UTHSC 04-1012	Clínica, lesió genoll, EUA	-	-	AM399020
UTHSC 04-771	Clínica, lesió braç, EUA	AM748695	AM747287	AM398985
UTHSC 04-797	Clínica, sang, EUA	-	-	AM399013
UTHSC 03-3124	Clínica, lesió, EUA	-	-	AM398996
UTHSC 03-1684	Clínica, lesió al canell, EUA	-	-	AM398989
UTHSC 03-1627	Clínica, rentat bronquial, EUA	-	-	AM398987
UTHSC 03-823	Clínica, lesió de canell, EUA	-	-	AM398991
UTHSC 02-2723	Clínica, lesió de canell, EUA	-	-	AM399007
UTHSC 02-510	Clínica, mucositat, EUA	-	-	AM398986
UTHSC 01-2137	Clínica, ulcera cutània, EUA	-	-	AM398983
UTHSC 00-1734	Clínica, aspirat de genoll EUA	-	-	AM398988
UTHSC 00-1488	Clínica, lesió al genoll, EUA.	-	-	AM399009
UTHSC 00-603	Clínica, teixit nasal, EUA	-	-	AM399010
UTHSC 99-173	Clínica, biòpsia de teixit de la mà, EUA	-	-	AM399011
FMR 9051	Clínica, desconegut, Venèçuela	-	-	AM490342
FMR 9052	Clínica, desconegut, Venèçuela	-	-	AM490341
FMR 9054	Clínica, desconegut, Venèçuela	-	-	AM490343
FMR 9055	Clínica, desconegut, Venèçuela	-	-	AM490344
FMR 9113	Clínica, desconegut, Venèçuela	-	-	AM490345
FMR 9114	Clínica, desconegut, Venèçuela	-	-	AM490346

Soques inclosos a l'estudi, origen i nº d'accés al EMBL (Cont.)

Aïllat	Origen	nº EMBL		
		CHS	BT2	CAL
FMR 9115	Clínica, desconegut, Venèguela	-	-	AM490347
FMR 9275	Clínica, desconegut, Venèguela	-	-	AM490355
FMR 9276	Clínica, desconegut, Venèguela	-	-	AM490356
FMR 9277	Clínica, desconegut, Venèguela	-	-	AM490357
FMR 9278	Clínica, desconegut, Venèguela	-	-	AM490337
FMR 9279	Clínica, desconegut, Venèguela	-	-	AM490338
FMR 9280	Clínica, desconegut, Venèguela	-	-	AM490339
CBS 120340	Clínica, lesió de la cara, Espanya	AM117422	AM116966	AM116908
NBRC 5984	Desconegut	AM117424	AM116967	AM116900
NBRC 6072	Desconegut	AM117420	AM116960	AM116904
FMR 8594	Clínica, lesió a la mà, Espanya	AM114864	AM116965	AM116906
FMR 8595	Clínica, lesió al canell , Espanya	AM117425	AM116959	AM116905
FMR 8596	Clínica, lesió al braç, Espanya	AM114866	AM116963	AM116902
FMR 8597	Clínica, lesió a la cama, Espanya	AM117426	AM116964	AM116907
FMR 8598	Clínica, lesió al braç, Espanya	AM114867	AM116962	AM116903
FMR 8601	Clínica, lesió als dits de la ma, Espanya	AM114865	AM116958	AM116901
FMR 8602	Clínica, lesió a la mà, Espanya	AM117423	AM116961	AM116909
FMR 9020	Clínica, desconegut, Japó	-	-	AM398994
FMR 9021	Clínica, desconegut, Japó	-	-	AM398993
FMR 9022	Clínica, desconegut, Japó	-	-	AM398995
FMR 9023	Clínica, desconegut, Japó	-	-	AM399016
KMU 4208	Ambiental, blat, Xina	-	-	AM399002
KMU 4214	Ambiental, canya, Xina	-	-	AM399003
KMU 4210	Ambiental, terra, Xina	-	-	AM399005
KMU 4116	Ambiental, Xina	-	-	AM399019
UTHSC 04-1485	Clínica, teixit cutani, EUA.	-	-	AM399015

Soques inclosos a l'estudi, origen i nº d'accés al EMBL (Cont.)

Aïllat	Origen	nº EMBL		
		CHS	BT2	CAL
IHEM 4178	Ambiental, desconegut, Itàlia	-	-	AM399018
MCCL 220029	Clínica, desconegut, Índia	-	-	AM490358
MCCL 220087	Clínica, desconegut, Índia	-	-	AM490359
MCCL 220038	Clínica, desconegut, Índia	-	-	AM490360
MCCL 220045	Clínica, desconegut, Índia	-	-	AM490361
MCCL 220082	Clínica, desconegut, Índia	-	-	AM490362
MCCL 220084	Clínica, desconegut, Índia	-	-	AM490363
MCCL 220040	Clínica, desconegut, Índia	-	-	AM490348
MCCL 220011	Clínica, desconegut, Índia	-	-	AM490349
MCCL 220030	Clínica, desconegut, Índia	-	-	AM490350
MCCL 220049	Clínica, desconegut, Índia	-	-	AM490351
MCCL 220010	Clínica, desconegut, Índia	-	-	AM490352
MCCL 220085	Clínica, desconegut, Índia	-	-	AM490353
UTHSC 99-625	Clínica, teixit de la mà, EUA.	-	-	AM398982
UTHSC 05-127	Clínica, teixit de la mà, EUA.	-	-	AM398992
CBS 239.68 (Soca tipus de S. inflata)	Ambiental, camp de blat, Alemanya	-	-	-
CBS 302.73 (Soca tipus de S. albicans)	Ambiental, terra, Regne Unit	AM748692	AM498343	AM398396
CBS 111110	Ambiental, Zootermopsis nevadensis, Alemanya	AM748693	AM747286	AM398382
KMU 4117	Ambiental, desconegut, Xina	-	-	*
KMU 4118	Ambiental, desconegut, Xina	-	-	*
KMU 4119	Ambiental, desconegut, Xina	-	-	*
KMU 4121	Ambiental, desconegut, Xina	-	-	*
KMU 4201	Ambiental, canya, Xina	-	-	*
KMU 4202	Ambiental, canya, Xina	-	-	*
KMU 4203	Ambiental, canya, Xina	-	-	*

Soques inclosos a l'estudi, origen i nº d'accés al EMBL (Cont.)

Aïllat	Origen	nº EMBL		
		CHS	BT2	CAL
KMU 4205	Ambiental, terra, Xina	-	-	*
KMU 4206	Ambiental, canya, Xina	-	-	*
KMU 4207	Ambiental, terra, Xina	-	-	*
KMU 4209	Ambiental, canya, Xina	-	-	*
KMU 4211	Ambiental, canya, Xina	-	-	*
KMU 4213	Ambiental, canya, Xina	-	-	*
KMU 4215	Ambiental, canya, Xina	-	-	*
KMU 4217	Ambiental, blat, Xina	-	-	*
KMU 4218	Ambiental, blat, Xina	-	-	*
CBS 120341	Ambiental, terra roser, Mèxic	AM748696	AM498344	AM398393
CBS 120342	Ambiental, clavell, Mèxic	AM748697	AM747288	AM398392
CBS 292.55 (soca tipus de Sporotrichum tropicale)	Clínica, desconegut, Regne Unit	-	-	AM490354
CBS 937.72 (soca tipus de S.schenckii var. luriei)	Clínica, desconegut, Sud Àfrica	AM748698	AM747289	AM747302

Abreviacions: IPEC, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fiocruz, Brasil; FMR, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Reus, Espanya ; IHEM, The BCCM™/IHEM biomedical fungi and yeasts collection, Bèlgica; CBS, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Holanda; NBRC, Biological Resource Center - Chiba, Japó; KMu Kanazawa Medical University, Ishikawa, Japó; UTHSC Fungus Testing Laboratory, University of Texas, Health Science Center, EUA; MCCL, Mycology Culture Collection Laboratory, Postgraduate Institute of Medical Education and Research, Chandigarh, Índia; CHS, gen de la quitina sintasa; BT2, gen de la β-tubulina; CAL, gen de la calmodulina; * Soques pendents de dipòsit

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
FILOGÈNIA MOLECULAR I CARACTERITZACIÓ FENOTÍPICA DEL COMPLEX D'ESPÈCIES DE
SPOROTHRIX SCHENCKII
Rita Marimón Picó
ISBN: 978-84-691-1554-1 /DL:T.147-2008

ANNEX 2

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

FILOGÈNIA MOLECULAR I CARACTERITZACIÓ FENOTÍPICA DEL COMPLEX D'ESPÈCIES DE
SPOROTHRIX SCHENCKII

Rita Marimón Picó

ISBN: 978-84-691-1554-1 /DL:T.147-2008

Molecular Phylogeny of *Sporothrix schenckii*

Rita Marimón,¹ Josepa Gené,^{1*} Josep Cano,¹ Luciana Trilles,²
Márcia Dos Santos Lazéra,² and Josep Guarro¹

Unitat de Microbiologia, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Tarragona, Spain,¹
and Serviço de Micologia Médica, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil²

Received 13 January 2006/Returned for modification 22 February 2006/Accepted 16 June 2006

The pathogenic dimorphic fungus *Sporothrix schenckii* is the agent responsible for sporotrichosis, an important fungal infection with a worldwide distribution. Little is known about the population structure of *S. schenckii*, although recent molecular and phenotypic data seem to demonstrate that different genetic lineages exist within this species. The aim of this study was to determine, by sequence analysis of three protein coding loci (chitin synthase, β -tubulin, and calmodulin), whether this variability is due to species divergence or intraspecific diversity in *S. schenckii*. We included in the analysis 60 isolates (59 of clinical and 1 of environmental origin) of this species from a wide geographical range. DNA sequence data from the three nuclear regions were used in a phylogenetic analysis. The combined analysis of the three loci revealed the presence of three major clades, one grouping all of the European isolates, another with only Brazilian isolates, and the third with isolates from other South American countries and Africa. A total of 14 100% bootstrap-supported nodes were shown, 6 of them representing putative phylogenetic species. Our data also demonstrated that most of these species prevail in different geographical regions.

Sporothrix schenckii is a thermally dimorphic fungus responsible for sporotrichosis, a chronic granulomatous infection of the skin and subcutaneous tissues, although it can disseminate, affecting any organ of the human body (3). The infection is distributed worldwide, although it is more common in tropical and subtropical areas. Despite the clinical importance of *S. schenckii*, little is known about its basic biology and population structure. *S. schenckii* has its natural habitat in soil and plants, although it has been isolated from a variety of other sources (5, 14, 26). Recent molecular studies have demonstrated the existence of a high level of intraspecific variability and that isolates are mainly grouped according to their geographical origin (10, 11, 14, 16). More recently, on the basis of internal transcribed spacer (ITS) region sequence analysis, it has been suggested that more than one species could exist within *S. schenckii* (27). Travassos and Lloyd (26) and Ghosh et al. (6) had also found morphological and physiological differences between isolates of clinical origin and those from other sources. Differences in virulence between clinical and environmental strains were reported, but no correlation was found with the different clinical forms of sporotrichosis (5, 16, 25). In this study, we have used DNA sequence data from multiple loci to assess the extent of clonality within a group of clinical isolates of *S. schenckii* from different geographic regions. Several molecular studies based on multiple gene sequences have demonstrated the existence of numerous phylogenetic species within well-established morphological species (4, 7, 17). However, the definition of phylogenetic species is controversial (13). Taylor et al. (24) argued that in the recognition of phylogenetic species, one-gene ge-

nealogy is not enough and the concordance of multiple-gene genealogies is required. The Rio de Janeiro region has been affected by a long-lasting outbreak of cat-transmitted sporotrichosis (22). The aim of the present study was to determine if these infections are caused by a single, highly virulent strain or by strains with multiple origins.

MATERIALS AND METHODS

Fungal isolates. Sixty isolates morphologically identified as *S. schenckii* (59 from clinical sources and 1 from an environmental source) were included in this study (Table 1). Clinical isolates were provided by different reference culture collections (Centraalbureau voor Schimmelfcultures, Utrecht, The Netherlands; Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Reus, Spain; BCCM/IHEM Biomedical Fungi and Yeasts Collection, Brussels, Belgium; Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, FIOCRUZ, Brazil; Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil; and Biological Resource Center, Chiba, Japan). Most of the clinical isolates from Brazil (18 isolates) and the environmental isolate were related to a long-lasting outbreak of cat-transmitted sporotrichosis (22). Clinical isolates were from 11 patients, and the environmental isolate was from the house dust of one of these patients. Isolates were stored on potato dextrose agar (Difco Laboratories, Detroit, Mich.) at 4 to 7°C and in slant cultures submerged in mineral oil at room temperature.

DNA extraction, amplification, and sequencing. DNA was extracted and purified directly from fungal colonies by following the Fast DNA kit protocol (Bio 101, Inc., Vista, Calif.) with the homogenization step repeated three times with a FastPrep FP120 instrument (Thermo Savant, Holbrook, N.Y.). After each homogenization, the sample was kept in ice for 10 min. DNA was quantified with GeneQuant *pro* (Amersham Pharmacia Biotech, Cambridge, England). Regions of the following nuclear genes were amplified by PCR: the chitin synthase (CHS) gene with primers CHS-79F and CHS-354R (2), the calmodulin (CAL) gene with degenerated primers CL1 and CL2A (17), and the β -tubulin (Bt2) gene with degenerated primers designed by us, i.e., Bt2-F [5'GG[CT]AACCA(AG)AT(A TC)GGTGC(CT)GC(CT)3'] and Bt2-R [5'ACCCTC(AG)GTGT AGTGACC CTGGC3'] from primers Bt2a and Bt2b described by Glass and Donaldson (8). Amplifications were done by following the Ready-To-Go PCR bead protocol (Amersham Bioscience, Freiburg, Germany). For each reaction, we added 20 to 60 ng of DNA template and a 0.5 to 1 mM concentration of each primer in a total volume of 25 μ l. The amplification program included an initial denaturation at 94°C for 5 min, followed by 35 cycles consisting of denaturation at 95°C for 30 s, annealing for 1 min at 55°C (CHS) or 60°C (CAL and Bt2), and extension for 1 min at 72°C. A final extension step of 72°C for 7 min was included. The PCR

* Corresponding author. Mailing address: Unitat de Microbiologia, Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Virgili, Carrer Sant Llorenç 21, 43201 Reus, Tarragona, Spain. Phone: 34 977759359. Fax: 34 977759322. E-mail: josepa.gene@urv.cat.

TABLE 1. Isolates included in this study and their origins^a

Isolate	Source	EMBL accession no.		
		CHS	Bt2	CAL
IPEC 16042	Skin lesion, Rio de Janeiro, Brazil	AM117416	AM116932	AM116885
IPEC 16243	Skin lesion, Rio de Janeiro, Brazil	AM117419	AM116957	AM116877
IPEC 16490	Skin lesion, Rio de Janeiro, Brazil	AM117417	AM116946	AM116899
IPEC 16503	Skin lesion, Rio de Janeiro, Brazil	AM114894	AM116941	AM116875
IPEC 16550	Skin lesion, Rio de Janeiro, Brazil	AM114893	AM116953	AM116892
IPEC 16864	Skin lesion, Rio de Janeiro, Brazil	AM117414	AM116951	AM116889
IPEC 16919	Skin lesion, Rio de Janeiro, Brazil	AM117407	AM116934	AM116898
IPEC 15572	Skin lesion, Rio de Janeiro, Brazil	AM117411	AM116955	AM116886
IPEC 16456	Skin lesion, Rio de Janeiro, Brazil	AM117406	AM116931	AM116897
IPEC 17943	Cerebrospinal fluid, Rio de Janeiro, Brazil	AM117410	AM116935	AM116878
IPEC 17307	Skin lesion, Rio de Janeiro, Brazil	AM117415	AM116949	AM116896
IPEC 17331	Skin lesion, Rio de Janeiro, Brazil	AM114899	AM116939	AM116880
IPEC 17608	Skin lesion, Rio de Janeiro, Brazil	AM117408	AM116937	AM116890
IPEC 17692	Skin lesion, Rio de Janeiro, Brazil	AM114897	AM116933	AM159127
IPEC 17920	Skin lesion, Rio de Janeiro, Brazil	AM114891	AM116938	AM116888
IPEC 17786	Skin lesion, Rio de Janeiro, Brazil	AM114898	AM116954	AM116884
IPEC 17521	Skin lesion, Rio de Janeiro, Brazil	AM114895	AM116952	AM116874
IPEC 17585	Skin lesion, Rio de Janeiro, Brazil	AM114892	AM116940	AM116887
IPEC 22487	Blood, Rio de Janeiro, Brazil	AM117409	AM116944	AM116882
IPEC 22493.1	Skin lesion, Rio de Janeiro, Brazil	AM117412	AM116945	AM116894
IPEC 22493.2	Skin lesion, Rio de Janeiro, Brazil	AM114900	AM116936	AM116883
IPEC 22496.4	Skin lesion, Rio de Janeiro, Brazil	AM117413	AM116950	AM116895
IPEC 22496.5	Skin lesion, Rio de Janeiro, Brazil	AM114896	AM116947	AM116879
IPEC 22582	Bone biopsy, Rio de Janeiro, Brazil	AM114889	AM116956	AM116891
IPEC 22593	Sputum, Rio de Janeiro, Brazil	AM114890	AM116942	AM116893
IPEC 22542/2	Disseminated sporotrichosis, Rio de Janeiro, Brazil	AM117418	AM116948	AM116881
IHEM 3774	Human sporotrichosis, Colombia	AM114873	AM116921	AM117447
IHEM 3787	South Africa	AM114870	AM116925	AM117435
IHEM 15477	Puncture of nodule, Bolivia	AM114878	AM116916	AM117444
IHEM 15486	Human sporotrichosis, Peru	AM114882	AM116929	AM117432
IHEM 15489	Human sporotrichosis, Peru	AM114883	AM116926	AM117430
IHEM 15499	Human sporotrichosis, Peru	AM114885	AM116928	AM117434
IHEM 15502	Human sporotrichosis, Peru	AM114884	AM116927	AM117427
IHEM 15503	Human sporotrichosis, Peru	AM114881	AM116930	AM117433
IHEM 15508	Human sporotrichosis, Peru	AM114875	AM116924	AM117443
IHEM 15511	Human sporotrichosis, Peru	AM114874	AM116917	AM117440
CBS 359.36 ^T	NK	AM114872	AM116911	AM117437
NBRC 5984	NK	AM117424	AM116967	AM116900
NBRC 6072	NK	AM117420	AM116960	AM116904
NBRC 8158	NK	AM114868	AM116910	AM117438
FMR 8337	Domiciliary dust, Rio de Janeiro, Brazil	AM117421	AM116943	AM116876
FMR 8594	Hand lesion, Spain	AM114864	AM116965	AM116906
FMR 8595	Wrist lesion, Spain	AM117425	AM116959	AM116905
FMR 8596	Arm lesion, Spain	AM114866	AM116963	AM116902
FMR 8597	Leg lesion, Spain	AM117426	AM116964	AM116907
FMR 8598	Arm lesion, Spain	AM114867	AM116962	AM116903
FMR 8600	Face lesion, Spain	AM117422	AM116966	AM116908
FMR 8601	Finger lesion, Spain	AM114865	AM116958	AM116901
FMR 8602	Hand lesion, Spain	AM117423	AM116961	AM116909
FMR 8604	Cutaneous lymphatic lesion, Peru	AM114886	AM116914	AM117429
FMR 8605	Cutaneous lymphatic lesion, Peru	AM114869	AM116923	AM117442
FMR 8606	Cutaneous lymphatic lesion, Peru	AM114888	AM116913	AM117431
FMR 8607	Cutaneous lymphatic lesion, Peru	AM114887	AM116912	AM117428
FMR 8608	Cutaneous lymphatic lesion, Peru	AM114879	AM116919	AM117441
FMR 8609	Cutaneous lymphatic lesion, Peru	AM114880	AM116918	AM117439
FMR 8677	Disseminated sporotrichosis, Argentina	AM114871	AM116914	AM117436
FMR 8678	Skin biopsy, Argentina	AM114876	AM116920	AM117446
FMR 8679	Cutaneous lymphatic nodule, Argentina	AM114877	AM116922	AM117445
FMR 9034	Human sporotrichosis, São Paulo, Brazil	AM261684	AM261686	AM261688
FMR 9035	Human sporotrichosis, São Paulo, Brazil	AM261685	AM261687	AM261689

^a Abbreviations: IPEC, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil; IHEM, The BCM/HEM Biomedical Fungi and Yeasts Collection, Brussels, Belgium; CBS, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands; NBRC, Biological Resource Center, Chiba, Japan; FMR, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Reus, Spain; CHS, chitin synthase gene; Bt2, β -tubulin gene; CAL, calmodulin gene; T, type strain; NK, not known.

products were purified with a GFX™ PCR DNA purification kit (Pharmacia Biotech, Cerdanyola, Spain) and stored at -20°C until sequencing. PCR products were sequenced by using the above-mentioned primers and following the *Taq* DyeDeoxy Terminator cycle sequencing kit protocol (Applied Biosystems,

Gouda, The Netherlands). DNA sequencing reaction mixtures were analyzed on a 310 DNA sequencer (Applied Biosystems).

Phylogenetic analysis. The sequences were aligned with the ClustalX (version 1.81) computer program (25), followed by manual adjustments with a text editor.

TABLE 2. Variability of loci used in the 60 isolates tested^a

Locus	No. of bp sequenced	No. of genotypes	No. (%) of variable sites	No. of parsimony-informative sites	No. of synonymous sites	No. of genotypes/variable base
CHS	280	8	13 (4.6)	11	13	0.61
Bt2	410	13	42 (10.24)	37	5	0.30
CAL	776	21	100 (12.8)	84	5	0.21

^a Abbreviations: CHS, chitin synthase gene; Bt2, β -tubulin gene; CAL, calmodulin gene.

The number of nonsynonymous and synonymous mutations was calculated by the method of Nei and Gojobori (15) implemented in the DnaSP program (19). The most parsimonious trees were produced in PAUP* (phylogenetic analysis using parsimony and other methods), version 4.0b10 (23). One hundred heuristic searches were performed by random sequence addition and tree bisection-reconnection branch-swapping algorithms, collapsing zero-length branches, and saving all minimal-length trees (MulTrees) on different sets of data. Gaps were treated as missing data. Support for internal branches was assessed by a heuristic parsimony search of 500 bootstrapped sets of data. The combined data set was tested for incongruence with the partition homogeneity test as implemented in PAUP*. To test alternative phylogenetic relationships, the Kishino-Hasegawa maximum-likelihood ratio test (12) was performed as implemented in PAUP*.

Nucleotide sequence accession numbers. All of the sequences determined in this study were deposited in the EMBL database and assigned the accession numbers listed in Table 1.

RESULTS

With the primers used, we were able to amplify and sequence 280 bp, 410 bp, and 776 bp of the CHS, Bt2, and CAL loci, respectively, in 60 isolates of *S. schenckii* (Table 1). Of the 1,466 nucleotides sequenced, 1,311 were constant, 132 (9%) were parsimony informative, and 23 were variably parsimony noninformative. The lowest number was 11 in the CHS fragment, and the highest was 87 in the CAL fragment. The total numbers of nonsynonymous and synonymous changes were 0 and 23 (13 in CHS, 5 in Bt2, and 5 in CAL), respectively (Table 2). Sequences of the three genes were analyzed phylogenetically as separate and combined data sets.

In all of the trees obtained from the phylogenetic analysis of each locus, three main clades were shown. One comprised all of the isolates from Brazil (clade I), including also the only environmental isolate tested. Another clade (clade II) grouped the rest of the South American isolates and three more isolates, including the type strain. The third clade (clade III) grouped the European isolates, all from Spain, with the exception of two isolates of unknown origin.

The result of the partition homogeneity test showed that sequence data sets of the three loci were congruent ($P = 0.11$) and could therefore be combined. A total of 5,000 most parsimonious trees were produced by a heuristic search using the combined data set of 1,466 characters from the three loci. The trees had a consistency index of 0.925, a retention index of 0.991, and a homoplasy index of 0.074. A total of 29 different genotypes could be distinguished (Fig. 1). A total of 14 100% bootstrap-supported nodes were shown, representing six putative phylogenetic species. The clustering was similar to that observed in the particular trees of the different genes analyzed, especially with the CAL locus. The tree showed the same three main clades observed with the other loci, each of them receiving 100% bootstrap support.

The 18 isolates related to the long-lasting Brazilian outbreak

of cat-transmitted sporotrichosis were located with the rest of the isolates from this country in clade I. They were isolated from 11 patients (Table 3). Four patients had more than one isolate. In two cases (P3 and P8), these belonged to a single genotype. Patients P4 and P9 were infected by two different genotypes each. The 18 isolates belonged to a total of six genotypes. Genotype G1 was the most common, infecting seven patients. Genotypes G1 and G2 were also present in other patients from Brazil not related to the outbreak.

Clade II was divided into two highly (100%) supported subclades (IIa and IIb). The Peruvian isolates, which were the most numerous after the Brazilian ones, were distributed into two different branches (IIa-1 and IIb-1), each with 100% bootstrap support. Subclade IIa was further divided into IIa-1, which included isolates from other countries (Bolivia, Colombia, and Argentina), and IIa-2, which had one isolate of unknown origin and the type strain. A similar distribution was observed in subclade IIb, in which the Peruvian branch (IIb-1) formed a phylogenetic group clearly separated from the other branch (IIb-2) comprising two isolates, one from South Africa and one from Argentina. This analysis showed the existence of a European clade (clade III). The latter clade was the most phylogenetically distant.

DISCUSSION

This report contains the results of a molecular phylogenetic analysis of the *S. schenckii* species complex inferred from DNA sequence data from three different loci. One of the most interesting results is the discovery that the isolates of *S. schenckii*, practically all of clinical origin, were grouped into six putative phylogenetic species. These cryptic species were further subdivided into a number of smaller groups that appear to be reproductively isolated in nature. This suggests not only that the existing *S. schenckii* populations are in the process of divergence but also that all of the resulting lineages are undergoing separation into distinct taxa. Our results were validated by the recent study of Neyra et al. (16), who analyzed the genetic diversity of the same Peruvian isolates that we tested, by using amplified fragment length polymorphism analysis and ITS2 sequencing. In that study, the isolates were grouped into two clades that were similar to those obtained in our phylogenetic trees.

Another interesting aspect of our analysis was the finding that each of the main groups exhibited a degree of geographical specificity, which agrees with previous reports (14, 16). The possible existence of different species within *S. schenckii* was already suggested by Wilhelm de Beer et al. (27) on the basis of the analysis of the sequences of the ITS regions of 11 clinical

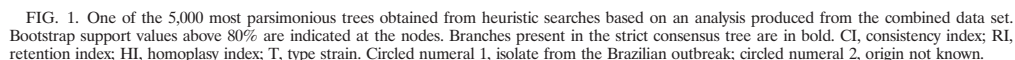


TABLE 3. Genetic relationship between *S. schenckii* clinical isolates from the Brazilian cat-transmitted outbreak

Patient	Isolate ^a	Date	Genotype
P1	IPEC 16042	29/04/1999	G1
P2	IPEC 16243	11/06/1999	G1
P3	IPEC 16490	09/08/1999	G1
P3	IPEC 16503	12/08/1999	G1
P4	IPEC 16550	19/08/1999	G2
P4	IPEC 16864	04/11/1999	G3
P4	IPEC 16919	22/01/1999	G2
P5	IPEC 15572	19/11/1998	G4
P6	IPEC 16456	29/07/1999	G1
P7	IPEC 17307	16/03/2000	G1
P8	IPEC 17331	19/10/2000	G1
P8	IPEC 17608	01/06/2000	G1
P8	IPEC 17692	16/06/2000	G1
P8	IPEC 17920	17/08/2000	G1
P9	IPEC 17786	13/07/2000	G2
P9	IPEC 17521	04/05/2000	G5
P10	IPEC 17585	25/05/2000	G6
P11	IPEC 22487	30/01/2003	G1

^a IPEC, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil.

and environmental isolates from South Africa. Our results disagree with those of Ishizaki (10), who found, by using mitochondrial DNA analysis, that all of the clinical isolates studied (more than 500) belonged to the same species.

In our study, the combined analysis of the three loci revealed the presence of two major groups, one including the European isolates and the other the South American and South African isolates (Fig. 1). In the latter group, two clades were observed, one formed by the 29 Brazilian isolates and the second by the rest. These results agree with those of Neyra et al. (16), in whose amplified fragment length polymorphism study the European isolates, two from Belgium and one from Italy, were also the most distantly placed and clearly separated from the American isolates. In our study, one South African isolate was close to one South American isolate. This result is in agreement with that of Ishizaki et al. (11), who found, by using restriction fragment length polymorphism analysis of mitochondrial DNA, that the South American isolates studied were related to the South African isolates studied. The 24 mitochondrial DNA restriction fragment length polymorphism types described were classified into two large phylogenetic groups, one predominant in South America and Africa and the other predominant in Australia and Asia. The biogeographical pattern shown in all of these studies seems to correlate with the events associated with the formation of natural barriers created by the fragmentation of the ancient supercontinent Gondwana in the upper Cretaceous period through the Paleocene period over the last 100 million years. O'Donnell et al. proposed this to account for the radiating speciation of the *Gibberella fujikuroi* species complex (18).

Although the genetic separation is considerable among the three major monophyletic clades, i.e., the Spanish clade, the Brazilian clade, and the clade made up of the rest of the South American isolates, each of them shows a high level of clonality. Primitive populations were probably isolated by the separation of the continents, and the formation of natural barriers facilitated their speciation as they became adapted to hosts en-

demic to the different regions. However, although geographical separation of the main clades is clearly evident, the different genotypes present within them are not related to geography (16), which seems to indicate that there has been interbreeding within these isolated populations.

Our analysis revealed that six different genotypes were present in a sample of 18 isolates from the Brazilian outbreak of cat-transmitted sporotrichosis, which demonstrates that the infections are not caused by a single, highly virulent genotype, as could be thought. In the city of Rio de Janeiro and the surrounding areas, from 1987 to 1997, only 13 cases of human sporotrichosis were recorded, but from 1998 to 2004, 759 human cases were reported (21). It is difficult to explain this dramatic increase in *Sporothrix* infections in this region. The researchers who have reported all of these cases are unable to provide an explanation for this epidemic (21). However, it should be noted that the highest number of cases occurred in an area characterized by underprivileged socioeconomic conditions and precarious health services. The typical human patients were female, mainly housewives, which is normal if we consider that members of this group are those most frequently exposed to the fungus because they care for cats (22). Barros et al. (1) explained the wide dissemination of the disease with factors related to the behavior of cats which, although cohabiting with human beings, do not always stay in the house but also circulate in the neighborhood, often getting involved in fights with other animals and coming into contact with soil and plants.

In conclusion, *S. schenckii* appears to be a complex of species, some prevailing in certain geographical regions. An accurate knowledge of species limits could be of high medical interest, as they may show different clinical patterns and respond differently to therapy. For instance, the Brazilian isolates present a distinctive clinical picture with immune manifestations (erythema multiforme) (9), disseminated cutaneous lesions, and atypical forms (20).

ACKNOWLEDGMENTS

We are indebted to the curators of the Centraalbureau voor Schimmelfcultures (Utrecht, The Netherlands), the BCCM/IHEM Biomedical Fungi and Yeasts Collection (Brussels, Belgium), J. M. Torres (IMIM, Hospital del Mar, Barcelona, Spain), C. Rubio (Hospital Universitario Lozano Blesa, Zaragoza, Spain), R. Negroni (Hospital de Infecções Francisco Javier Muñoz, Buenos Aires, Argentina), and P. Godoy (Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil) for supplying many of the strains used in this study.

This study was supported by Spanish Ministerio de Ciencia y Tecnología grant CGL 2004-00425/BOS.

REFERENCES

1. Barros, M. B., A. O. Schubach, A. C. do Valle, M. C. Gutierrez Galhardo, F. Conceicao-Silva, T. M. Schubach, R. S. Reis, B. Wanke, K. B. Marzochi, and M. J. Conceicao. 2004. Cat-transmitted sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil: description of a series of cases. Clin. Infect. Dis. 38:529-535.
2. Carbone, L., and L. M. Kohn. 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. Mycologia 91:553-556.
3. de Hoog, G. S., J. Guarro, J. Gené, and M. J. Figueras. 2000. Atlas of clinical fungi, 2nd ed. Centraalbureau voor Schimmelfcultures, Utrecht, The Netherlands.
4. Dettman, J. R., D. J. Jacobson, and J. W. Taylor. 2003. A multilocus genealogical approach to phylogenetic species recognition in the model eukaryote *Neurospora*. Evol. Int. J. Org. Evol. 57:2703-2720.
5. Dixon, D. M., I. F. Salkin, R. A. Duncan, N. J. Hurd, J. H. Haines, M. E. Kemna, and F. B. Coles. 1991. Isolation and characterization of *Sporothrix*

- schenkii* from clinical and environmental sources associated with the largest U.S. epidemic of sporotrichosis. *J. Clin. Microbiol.* **29**:1106–1113.
6. Ghosh, A., P. K. Maity, B. M. Hemashettar, V. K. Sharma, and A. Chakrabarti. 2002. Physiological characters of *Sporothrix schenckii* isolates. *Mycoses* **45**:449–454.
 7. Gilgado, F., J. Cano, J. Gené, and J. Guarro. 2005. Molecular phylogeny of the *Pseudallescheria boydii* species complex: proposal of two new species. *J. Clin. Microbiol.* **43**:4930–4942.
 8. Glass, N., and G. Donaldson. 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:1323–1330.
 9. Gutierrez-Galhardo, M. C., M. B. Barros, A. O. Schubach, T. Cuzzi, T. M. Schubach, M. S. Lazera, and A. C. Valle. 2005. Erythema multiforme associated with sporotrichosis. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **19**:507–509.
 10. Ishizaki, H. 2003. Mitochondrial DNA analysis of *Sporothrix schenckii*. *Jpn. J. Med. Mycol.* **44**:155–157.
 11. Ishizaki, H., M. Kawasaki, M. Aoki, T. Matsumoto, A. A. Padhye, M. Mendoza, and R. Negróni. 1998. Mitochondrial DNA analysis of *Sporothrix schenckii* in North and South America. *Mycopathologia* **142**:115–118.
 12. Kishino, H., and M. Hasegawa. 1989. Evaluation of the maximum likelihood estimate of the evolutionary tree topologies from DNA sequence data, and the branching order in Hominoidea. *J. Mol. Evol.* **29**:170–179.
 13. Mayden, R. L. 1997. A hierarchy of species concepts: the denouement in the saga of the species problem, p. 381–424. *In* M. F. Claridge, H. A. Dawah, and M. R. Wilson (ed.), *Species: the units of biodiversity*. Chapman & Hall, London, United Kingdom.
 14. Mesa-Arango, A. C., M. R. Reyes-Montes, A. Pérez-Mejía, H. Navarro-Barranco, V. Souza, G. Zúñiga, and C. Toriello. 2002. Phenotyping and genotyping of *Sporothrix schenckii* isolates according to geographic origin and clinical form of sporotrichosis. *J. Clin. Microbiol.* **40**:3004–3011.
 15. Nei, M., and T. Gojobori. 1986. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Mol. Biol. Evol.* **3**:418–426.
 16. Neyra, E., P. Fonteyne, D. Swinne, F. Fauche, B. Bustamante, and N. Noland. 2005. Epidemiology of human sporotrichosis investigated by amplified fragment length polymorphism. *J. Clin. Microbiol.* **43**:1348–1352.
 17. O'Donnell, K. 2000. Molecular phylogeny of the *Nectria haematococca-Fusarium solani* species complex. *Mycologia* **92**:919–938.
 18. O'Donnell, K., E. Cigelnik, and H. I. Nirenberg. 1998. Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia* **90**:465–493.
 19. Rozas, J., J. C. Sanchez del Barrio, X. Messeguer, and R. Rozas. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* **19**:2496–2497.
 20. Schubach, A., M. B. de Lima Barros, T. M. Schubach, A. C. Francesconi-do-Valle, M. C. Gutierrez-Galhardo, M. Sued, M. de Matos Salgueiro, P. C. Fialho-Monteiro, R. S. Reis, K. B. Marzochi, B. Wanke, and F. Conceicao-Silva. 2005. Primary conjunctival sporotrichosis: two cases from a zoonotic epidemic in Rio de Janeiro, Brazil. *Cornea* **24**:491–493.
 21. Schubach, A., T. M. Schubach, and M. B. L. Barros. 2005. Epidemic cat-transmitted sporotrichosis. *N. Engl. J. Med.* **353**:1185–1186.
 22. Schubach, A., T. M. Schubach, M. B. L. Barros, and B. Wanke. 2005. Cat-transmitted sporotrichosis, Rio de Janeiro, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* **11**:1952–1954.
 23. Swofford, D. L. 2001. PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). (version 4.0). Sinauer Associates, Sunderland, Mass.
 24. Taylor, J. W., D. J. Jacobson, S. Kroken, T. Kasuga, D. M. Geiser, D. S. Hibbett, and M. C. Fisher. 2000. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genet. Biol.* **31**:21–32.
 25. Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, and D. G. Higgins. 1997. The ClustalX Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **24**:4876–4882.
 26. Travassos, L. R., and K. O. Lloyd. 1980. *Sporothrix schenckii* and related species of *Ceratocystis*. *Microbiol. Rev.* **44**:683–721.
 27. Wilhelm de Beer, Z., T. C. Harrington, H. F. Vismer, B. D. Wingfield, and M. J. Wingfield. 2003. Phylogeny of the *Ophiostoma stenoceras-Sporothrix schenckii* complex. *Mycologia* **95**:434–441.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
FILOGÈNIA MOLECULAR I CARACTERITZACIÓ FENOTÍPICA DEL COMPLEX D'ESPÈCIES DE
SPOROTHRIX SCHENCKII
Rita Marimón Picó
ISBN: 978-84-691-1554-1 /DL:T.147-2008

ANNEX 3

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

FILOGÈNIA MOLECULAR I CARACTERITZACIÓ FENOTÍPICA DEL COMPLEX D'ESPÈCIES DE
SPOROTHRIX SCHENCKII

Rita Marimón Picó

ISBN: 978-84-691-1554-1 /DL:T.147-2008

Sporothrix brasiliensis, *S. globosa*, and *S. mexicana*, Three New *Sporothrix* Species of Clinical Interest[†]

Rita Marimón,¹ Josep Cano,¹ Josepa Gené,^{1*} Deanna A. Sutton,²
Masako Kawasaki,³ and Josep Guarro¹

Unitat de Microbiologia, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain¹; Department of
Pathology, University of Texas Health Science Center, San Antonio, Texas²; and Department of Dermatology,
Kanazawa Medical University, Ishikawa, Japan³

Received 16 April 2007/Returned for modification 5 July 2007/Accepted 31 July 2007

Sporothrix schenckii is the species responsible for sporotrichosis, a fungal infection caused by the traumatic implantation of this dimorphic fungus. Recent molecular studies have demonstrated that this species constitutes a complex of numerous phylogenetic species. Since the delineation of such species could be of extreme importance from a clinical point of view, we have studied a total of 127 isolates, most of which were received as *S. schenckii*, including the available type strains of species currently considered synonyms, and also some close morphological species. We have phenotypically characterized all these isolates using different culture media, growth rates at different temperatures, and numerous nutritional tests and compared their calmodulin gene sequences. The molecular analysis revealed that *Sporothrix albicans*, *S. inflata*, and *S. schenckii* var. *luriei* are species that are clearly different from *S. schenckii*. The combination of these phenetic and genetic approaches allowed us to propose the new species *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*. The key phenotypic features for recognizing these species are the morphology of the sessile pigmented conidia, growth at 30, 35, and 37°C, and the assimilation of sucrose, raffinose, and ribitol.

Sporothrix schenckii is a dimorphic fungus causing sporotrichosis, a severe infection usually acquired by the traumatic inoculation of colonized materials or by inhalation of spores through the respiratory tract (3, 6). Cutaneous lymphatic disease is the most common clinical manifestation, although other types of disease including disseminated infection are also produced. Sporotrichosis has a worldwide distribution, especially in tropical and subtropical areas. The natural habitat of *S. schenckii* is soil and plants. The teleomorph of this fungus has not yet been discovered, although a close genetic relationship between *S. schenckii* and the ascomycetous genus *Ophiostoma* has been demonstrated (2, 3). Contrary to previously reported suggestions, *Ophiostoma stenoceras* appears (5) not to be the teleomorph (4, 8, 27, 30). In recent years, numerous molecular studies involving *S. schenckii* have been carried out (13, 15, 22, 23, 25, 32, 34) and have clearly demonstrated the existence of several groups that are genetically different. In a recent multilocus study, we investigated the population structure of *S. schenckii* and showed the existence of at least six putative phylogenetic species prevalent in different geographical regions (20). In several in vitro antifungal susceptibility studies of clinical isolates of *S. schenckii*, a wide range of susceptibility to different drugs has been demonstrated (16, 21, 31). This suggests that these isolates could represent different species. If true, knowledge of their various responses to antifungal agents would be critical for appropriate patient management.

The aim of the present study was to phenotypically charac-

terize the different phylogenetic species of the *S. schenckii* complex in order to find key morphological and/or physiological features that would allow their recognition in the clinical laboratory. Only their reliable identification will allow us to study their epidemiology and to determine if different clinical patterns are associated with each of these species. Numerous additional isolates were included in the study in order to increase the robustness of the isolate sets representing the different species detected within the complex. These isolates were assigned to different lineages on the basis of their calmodulin sequences, the most phylogenetically informative locus found in our previous study (20).

MATERIALS AND METHODS

Fungal isolates. One hundred twenty-seven isolates were included in the study (Table 1). Isolates consisted of strains that were morphologically identified as being *S. schenckii* (mainly from clinical origin), the type strain of *S. schenckii* var. *luriei*, the available type strains of species currently considered synonyms of *S. schenckii* (*Sporothrix albicans*, *Sporotrichum tropicale*, and *Dolichoascus schenckii*), and the type strain of *Sporothrix inflata*, the morphologically closest species to *S. schenckii*. Isolates were stored on potato dextrose agar (PDA; Difco Laboratories, Detroit, MI) at 4 to 7°C and in slant cultures submerged in mineral oil at room temperature.

DNA extraction, amplification, and sequencing. The procedures for DNA extraction, amplification, sequencing, and phylogeny analysis of the nuclear calmodulin (CAL) gene were described previously by Marimón et al. (20). The primers used were CL1 and CL2A (24). The phylogenetic analysis was performed by using PAUP*, version 4.0b10 (28). Briefly, the most parsimonious trees were obtained after 100 heuristic searches with random sequence addition and tree bisection-reconnection branch-swapping algorithms, collapsing zero-length branches and saving all minimal-length trees (MuTrees).

Morphological studies. In order to study macroscopic features and sporulation (5, 8, 22), all the isolates were subcultured on PDA, cornmeal agar (CMA) (30 g corn, 15 g agar, 1 liter tap water), and oatmeal agar (30 g oat flakes, 1 g MgSO₄, 1.5 g KH₂PO₄, 15 g agar, 1 liter tap water) and incubated at 30°C in the dark. The microscopic features were determined primarily from slide cultures made on CMA after 10 to 12 days of incubation at 30°C. Coverslips were mounted in lactic

* Corresponding author. Mailing address: Unitat de Microbiologia, Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Virgili, Carrer Sant Llorenç 21, 43201 Reus, Tarragona, Spain. Phone: 34 977759359. Fax: 34 977759322. E-mail: josepa.gene@urv.cat.

[†] Published ahead of print on 8 August 2007.

TABLE 1. Fungal species, source code, geographical origin, and GenBank/EMBL/DBJ accession numbers for the isolates included in the study^a

Species	Received as species:	Isolate	Source	GenBank/EMBL/DBJ accession no. (CAL)
<i>S. albicans</i>	<i>S. schenckii</i>	CBS 302.73 ^T	Environmental, soil, United Kingdom	AM398396 ^a
<i>S. albicans</i>	<i>S. albicans</i>	CBS 111110	<i>Zootermopsis nevadensis</i> , Germany	AM398382 ^a
<i>S. brasiliensis</i>	<i>S. schenckii</i>	CBS 120339 ^T (IPEC 16390)	Clinical, Brazil	AM116899
<i>S. brasiliensis</i>	<i>S. schenckii</i>	IPEC 15572	Clinical, Brazil	AM116886
<i>S. brasiliensis</i>	<i>S. schenckii</i>	IPEC 16042	Clinical, Brazil	AM116885
<i>S. brasiliensis</i>	<i>S. schenckii</i>	IPEC 16243	Clinical, Brazil	AM116877
<i>S. brasiliensis</i>	<i>S. schenckii</i>	IPEC 16456	Clinical, Brazil	AM116897
<i>S. brasiliensis</i>	<i>S. schenckii</i>	IPEC 16503	Clinical, Brazil	AM116875
<i>S. brasiliensis</i>	<i>S. schenckii</i>	IPEC 16550	Clinical, Brazil	AM116892
<i>S. brasiliensis</i>	<i>S. schenckii</i>	IPEC 16864	Clinical, Brazil	AM116889
<i>S. brasiliensis</i>	<i>S. schenckii</i>	IPEC 16919	Clinical, Brazil	AM116898
<i>S. brasiliensis</i>	<i>S. schenckii</i>	IPEC 17307	Clinical, Brazil	AM116896
<i>S. brasiliensis</i>	<i>S. schenckii</i>	IPEC 17331	Clinical, Brazil	AM116880
<i>S. brasiliensis</i>	<i>S. schenckii</i>	IPEC 17521	Clinical, Brazil	AM116874
<i>S. brasiliensis</i>	<i>S. schenckii</i>	IPEC 17585	Clinical, Brazil	AM116887
<i>S. brasiliensis</i>	<i>S. schenckii</i>	IPEC 17608	Clinical, Brazil	AM116890
<i>S. brasiliensis</i>	<i>S. schenckii</i>	IPEC 17692	Clinical, Brazil	AM159127
<i>S. brasiliensis</i>	<i>S. schenckii</i>	IPEC 17786	Clinical, Brazil	AM116884
<i>S. brasiliensis</i>	<i>S. schenckii</i>	IPEC 17920	Clinical, Brazil	AM116888
<i>S. brasiliensis</i>	<i>S. schenckii</i>	IPEC 17943	Clinical, Brazil	AM116878
<i>S. brasiliensis</i>	<i>S. schenckii</i>	IPEC 22468	Clinical, Brazil	AM116882
<i>S. brasiliensis</i>	<i>S. schenckii</i>	IPEC 22493.1	Clinical, Brazil	AM116894
<i>S. brasiliensis</i>	<i>S. schenckii</i>	IPEC 22493.2	Clinical, Brazil	AM116883
<i>S. brasiliensis</i>	<i>S. schenckii</i>	IPEC 22496.4	Clinical, Brazil	AM116895
<i>S. brasiliensis</i>	<i>S. schenckii</i>	IPEC 22496.5	Clinical, Brazil	AM116879
<i>S. brasiliensis</i>	<i>S. schenckii</i>	IPEC 22543.2	Clinical, Brazil	AM116881
<i>S. brasiliensis</i>	<i>S. schenckii</i>	IPEC 22582	Clinical, Brazil	AM116891
<i>S. brasiliensis</i>	<i>S. schenckii</i>	IPEC 22593	Clinical, Brazil	AM116893
<i>S. brasiliensis</i>	<i>S. schenckii</i>	FMR 8337	Environmental, domiciliary dust, Brazil	AM116876
<i>S. brasiliensis</i>	<i>S. schenckii</i>	FMR 9034	Clinical, Brazil	AM261688
<i>S. brasiliensis</i>	<i>S. schenckii</i>	FMR 9035	Clinical, Brazil	AM261689
<i>S. globosa</i>	<i>S. schenckii</i>	CBS 120340 ^T (FMR 8600)	Clinical, Spain	AM116908
<i>S. globosa</i>	<i>Sporotrichum tropicale</i> ^b	CBS 292.55 ^T	Clinical, United Kingdom	AM490354 ^a
<i>S. globosa</i>	<i>S. schenckii</i>	FMR 8594	Clinical, Spain	AM116906
<i>S. globosa</i>	<i>S. schenckii</i>	FMR 8595	Clinical, Spain	AM116905
<i>S. globosa</i>	<i>S. schenckii</i>	FMR 8596	Clinical, Spain	AM116902
<i>S. globosa</i>	<i>S. schenckii</i>	FMR 8597	Clinical, Spain	AM116907
<i>S. globosa</i>	<i>S. schenckii</i>	FMR 8598	Clinical, Spain	AM116903
<i>S. globosa</i>	<i>S. schenckii</i>	FMR 8601	Clinical, Spain	AM116901
<i>S. globosa</i>	<i>S. schenckii</i>	FMR 8602	Clinical, Spain	AM116909
<i>S. globosa</i>	<i>S. schenckii</i>	FMR 9020	Clinical, Japan	AM398994 ^a
<i>S. globosa</i>	<i>S. schenckii</i>	FMR 9021	Clinical, Japan	AM398993 ^a
<i>S. globosa</i>	<i>S. schenckii</i>	FMR 9022	Clinical, Japan	AM398995 ^a
<i>S. globosa</i>	<i>S. schenckii</i>	FMR 9023	Clinical, Japan	AM399016 ^a
<i>S. globosa</i>	<i>S. schenckii</i>	KMU 4208	Environmental, wheat, China	AM399002 ^a
<i>S. globosa</i>	<i>S. schenckii</i>	KMU 4214	Environmental, reed, China	AM399003 ^a
<i>S. globosa</i>	<i>S. schenckii</i>	KMU 4200	Environmental, reed, China	AM399004 ^a
<i>S. globosa</i>	<i>S. schenckii</i>	KMU 4210	Environmental, soil, China	AM399005 ^a
<i>S. globosa</i>	<i>S. schenckii</i>	KMU 4116	Environmental, China	AM399019 ^a
<i>S. globosa</i>	<i>S. schenckii</i>	IHEM 4178	Clinical, Italy	AM399018 ^a
<i>S. globosa</i>	<i>S. schenckii</i>	UTHSC 04-1485	Clinical, United States	AM399015 ^a
<i>S. globosa</i>	<i>S. schenckii</i>	UTHSC 05-127	Clinical, United States	AM398992 ^a
<i>S. globosa</i>	<i>S. schenckii</i>	UTHSC 99-625	Clinical, United States	AM398982 ^a
<i>S. globosa</i>	<i>S. schenckii</i>	MCCL 220029	Clinical, India	AM490358 ^a
<i>S. globosa</i>	<i>S. schenckii</i>	MCCL 220087	Clinical, India	AM490359 ^a
<i>S. globosa</i>	<i>S. schenckii</i>	MCCL 220038	Clinical, India	AM490360 ^a
<i>S. globosa</i>	<i>S. schenckii</i>	MCCL 220045	Clinical, India	AM490361 ^a
<i>S. globosa</i>	<i>S. schenckii</i>	MCCL 220082	Clinical, India	AM490362 ^a
<i>S. globosa</i>	<i>S. schenckii</i>	MCCL 220084	Clinical, India	AM490363 ^a
<i>S. globosa</i>	<i>S. schenckii</i>	MCCL 220040	Clinical, India	AM490348 ^a
<i>S. globosa</i>	<i>S. schenckii</i>	MCCL 220011	Clinical, India	AM490349 ^a
<i>S. globosa</i>	<i>S. schenckii</i>	MCCL 220030	Clinical, India	AM490350 ^a
<i>S. globosa</i>	<i>S. schenckii</i>	MCCL 220049	Clinical, India	AM490351 ^a
<i>S. globosa</i>	<i>S. schenckii</i>	MCCL 220010	Clinical, India	AM490352 ^a
<i>S. globosa</i>	<i>S. schenckii</i>	MCCL 220085	Clinical, India	AM490353 ^a
<i>S. globosa</i>	<i>S. schenckii</i>	NBRC 5984	NK	AM116900
<i>S. globosa</i>	<i>S. schenckii</i>	NBRC 6072	NK	AM116904

Continued on following page

TABLE 1—Continued

Species	Received as species:	Isolate	Source	GenBank/EMBL/DBJ accession no. (CAL)
<i>S. inflata</i>	<i>S. inflata</i>	CBS 239.68 ^T	Environmental, wheat field, Germany	
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	CBS 359.36 ^T	Clinical, United States	AM117437
<i>S. schenckii</i>	<i>Dolichoascus schenckii</i> ^b	CBS 938.72 ^T	Clinical, France	AM490340 ^a
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	NBRC 8158	NK	AM117438
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	FMR 8604	Clinical, Peru	AM117429
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	FMR 8605	Clinical, Peru	AM117442
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	FMR 8606	Clinical, Peru	AM117431
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	FMR 8607	Clinical, Peru	AM117428
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	FMR 8608	Clinical, Peru	AM117441
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	FMR 8609	Clinical, Peru	AM117439
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	FMR 8677	Clinical, Argentina	AM117436
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	FMR 8678	Clinical, Argentina	AM117446
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	FMR 8679	Clinical, Argentina	AM117445
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	FMR 8716	Clinical, Peru	AM399006 ^a
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	FMR 8717	Clinical, Peru	AM399017 ^a
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	FMR 9051	Clinical, Venezuela	AM490342 ^a
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	FMR 9052	Clinical, Venezuela	AM490341 ^a
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	FMR 9054	Clinical, Venezuela	AM490343 ^a
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	FMR 9055	Clinical, Venezuela	AM490344 ^a
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	FMR 9113	Clinical, Venezuela	AM490345 ^a
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	FMR 9114	Clinical, Venezuela	AM490346 ^a
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	FMR 9115	Clinical, Venezuela	AM490347 ^a
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	FMR 9275	Clinical, Venezuela	AM490355 ^a
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	FMR 9276	Clinical, Venezuela	AM490356 ^a
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	FMR 9277	Clinical, Venezuela	AM490357 ^a
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	FMR 9278	Clinical, Venezuela	AM490337 ^a
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	FMR 9279	Clinical, Venezuela	AM490338 ^a
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	FMR 9280	Clinical, Venezuela	AM490339 ^a
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	IHEM 3774	Clinical, Colombia	AM117447
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	IHEM 3787	NK, South Africa	AM117435
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	IHEM 15477	Clinical, Bolivia	AM117444
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	IHEM 15486	Clinical, Peru	AM117432
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	IHEM 15489	Clinical, Peru	AM117430
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	IHEM 15499	Clinical, Peru	AM117434
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	IHEM 15502	Clinical, Peru	AM117427
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	IHEM 15503	Clinical, Peru	AM117433
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	IHEM 15508	Clinical, Peru	AM117443
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	IHEM 15511	Clinical, Peru	AM117440
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	UTHSC 05-2843	Clinical, United States	AM399012 ^a
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	UTHSC 05-802	Clinical, United States	AM399008 ^a
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	UTHSC 04-2235	Clinical, United States	AM398984 ^a
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	UTHSC 04-1718	Clinical, United States	AM398990 ^a
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	UTHSC 04-1064	Clinical, United States	AM399014 ^a
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	UTHSC 04-1012	Clinical, United States	AM399020 ^a
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	UTHSC 04-771	Clinical, United States	AM398985 ^a
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	UTHSC 04-797	Clinical, United States	AM399013 ^a
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	UTHSC 03-3124	Clinical, United States	AM398996 ^a
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	UTHSC 03-1684	Clinical, United States	AM398989 ^a
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	UTHSC 03-1627	Clinical, United States	AM398987 ^a
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	UTHSC 03-823	Clinical, United States	AM398991 ^a
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	UTHSC 02-2723	Clinical, United States	AM399007 ^a
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	UTHSC 02-510	Clinical, United States	AM398986 ^a
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	UTHSC 01-2137	Clinical, United States	AM398983 ^a
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	UTHSC 00-1734	Clinical, United States	AM398988 ^a
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	UTHSC 00-1488	Clinical, United States	AM399009 ^a
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	UTHSC 00-603	Clinical, United States	AM399010 ^a
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	UTHSC 99-173	Clinical, United States	AM399011 ^a
<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i> var. <i>luriei</i>	CBS 937.72 ^T	Clinical, South Africa	
var. <i>luriei</i>				
<i>S. mexicana</i>	<i>S. schenckii</i>	CBS 120341 ^T	Environmental, soil rose tree, Mexico	AM398393 ^a
<i>S. mexicana</i>	<i>S. schenckii</i>	CBS 120342	Environmental, carnation leaves, Mexico	AM398392 ^a

^a Sequences newly generated in this study.
^b Invalidly published species.
^c Abbreviations: IPEC, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fiocruz, Brazil; FMR, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Reus, Spain; IHEM, BCCM/IHEM Biomedical Fungi and Yeasts Collection, Belgium; CBS, Centraalbureau voor Schimmeltcultures, Utrecht, The Netherlands; NBRC, Biological Resource Center, Chiba, Japan; KMU, Kanazawa Medical University, Ishikawa, Japan; UTHSC, Fungus Testing Laboratory, University of Texas Health Science Center; MCCL, Mycology Culture Collection Laboratory, Postgraduate Institute of Medical Education and Research, Chandigarh, India; NK, not known; ^T, type strain.

acid and examined under a light microscope (Leitz Dialux 20). At least 25 measurements were recorded as the maximum and minimum values for each type of structure.

Physiologic studies. The growth rate at various temperatures (20, 25, 30, 35, 37, and 40°C) of all the isolates included in the study was determined on PDA. The petri dishes were centrally inoculated with pieces of the fungus that were approximately 1 mm in diameter, placed upside down. The colony diameters (in millimeters) were measured after 14 and 21 days of incubation. The mean of the diameters was determined to detect differences among isolates.

Assimilation of 35 carbon and seven nitrogen sources was tested in liquid medium according to methods described previously by Yarrow (33). The tests were done in 96-well microplates, with each column containing a standard 150- μ l amount of liquid nitrogen base medium (Becton Dickinson Co., Sparks, MD) or carbon base medium (Becton Dickinson Co.), with one test substrate, except those for the negative controls, which had only the base medium, and those for the positive controls, which contained glucose. An inoculum of 50 μ l was added to each well of the microdilution trays. The inocula were adjusted to an optical density that ranged from 0.21 to 0.29, which corresponded to a final inoculum in the microplate of 2×10^5 to 2×10^6 CFU/ml. The viability of the conidia was verified by plating 100 μ l of serial dilutions of each inoculum onto PDA. Microplates were read after 5 and 10 days of incubation at 25°C.

The presence of urease was determined after incubation on Christensen's urea agar slants at 25°C for 8 days. Urease production was noted by the development of a pink color. Acid production was tested on chalk agar (50 g glucose, 5 g CaCO₃, 5 g yeast extract, 20 g agar, 1 liter demineralized water) at 25°C, with cultures examined regularly for up to 4 weeks for clearing of the medium around the streaks (33). Gelatin liquefaction was tested on a medium composed of 100 g gelatin, 5 g glucose, 6.7 g nitrogen base medium, and 1 liter of demineralized water and incubated at 25°C for 60 days (33). After incubation, tubes were then refrigerated at 4°C for 1 h to check gelatin hydrolysis. Tolerance to NaCl, MgCl₂, and cycloheximide was tested as described above for the assimilation of carbon sources but in liquid nitrogen base medium with 5% glucose (7). Final concentrations were 0.1%, 0.25%, and 1% and 2%, 5%, and 10% for cycloheximide and NaCl and MgCl₂, respectively. The results were both read after 7 and 14 days of incubation at 25°C. The formation of extracellular polysaccharide was performed on agar medium in petri dishes, incubated at 25°C for 2 to 3 weeks, and then flooded with diluted Lugol's iodine and examined for the formation of a blue-green color (33).

Testing of the ability of isolates to convert to the yeast phase was performed according to procedures described previously by Ghosh et al. (9). Briefly, mycelial cultures grown on PDA were subcultured on brain heart infusion agar with 5% defibrinated sheep blood at 37°C for 6 to 9 days. Several successive passages were done to achieve the yeast form. The morphology of the yeast cells was examined on wet mounts with 85% lactic acid.

Nucleotide sequence accession numbers. The newly reported sequences generated in this study were deposited in the GenBank/EMBL/DBJ database under the accession numbers listed in Table 1.

RESULTS

Phylogeny. With the primers used, we were able to amplify and sequence 685 bp of CAL loci. Parsimony analysis of the CAL data set yielded 5,000 trees with 278 steps in length in which 20 nodes received 100% bootstrap support. All trees had a consistency index of 0.8885, a retention index of 0.9869, and a homoplasy index of 0.1115. There were 474 constant, 180 parsimony-informative, and 34 variable parsimony-uninformative characters in this fragment, which resulted in a total of 45 haplotypes. One of the most parsimonious trees is shown in Fig. 1. The isolates were distributed in five main clades (clades I to V) that were 100% statistically supported. All isolates of clinical origin were included in the first three clades (clades I to III), which correspond to the same main lineages obtained in our previous study (20). Clade I grouped only Brazilian isolates. Clade II included practically all of the American isolates. As in our previous study (20), clade II was again divided into two highly supported subclades (subclades IIa and IIb). The former subclade grouped most of the isolates from the United

States and South America (Argentina, Bolivia, Colombia, Peru, and Venezuela), the type strain of *S. schenckii*, and the type strain of *Dolichoascus schenckii*, while subclade IIb included the rest of isolates from South America (Peru and Argentina) and the only existing isolate from South Africa. Clade III was comprised of isolates from China, India, Italy, Japan, Spain, and the United States and the type strain of *Sporotrichum tropicale*, which was from England. Four environmental isolates formed the two basal clades, clades IV and V. Clade IV grouped two isolates from Mexico, and clade V grouped two isolates identified as being *S. albicans*, one from England (the type strain) and one from Germany. The only existing isolate of *S. schenckii* var. *luriei* and the type strain of *S. inflata* could not be included in the phylogenetic tree because of sequences that were shorter (ca. 300 bp) than the rest of the isolates due to the low specificity of the degenerate primer CL1. However, the length of these sequences was informative enough to prove that both taxa are considerably genetically distant from the rest of isolates included in this study.

Physiologic studies. All isolates demonstrated optimal growth between 20 and 30°C, and none grew at 40°C. The isolates in clades IV and V grew more quickly at 20 and at 30°C, and those in clade I showed the slowest growth at these same temperatures. All the isolates grew well at 35°C; however, those in clades III and IV showed the most restricted growth. Most isolates also grew at 37°C, except for the majority of strains in clade III. The mean colony diameters for isolates in the different clades tested at various temperatures are summarized in Table 2.

A relatively large number of carbon and nitrogen sources were assimilated by all the isolates tested, with no significant differences among them (data not shown). The most important variations were observed in the assimilation of sucrose, raffinose, and ribitol (Table 3). All the isolates were able to split urea after 8 days of incubation, none produced extracellular polysaccharides, and variable results were obtained for acid and gelatinase production. All the isolates tolerated cycloheximide at 0.25% and 10% MgCl₂. Variable results were obtained for tolerance to different concentrations of NaCl among isolates of the same clade (data not shown).

Most isolates were able to convert, at least partially, to a yeast phase, and no significant differences were observed among clades.

Morphological studies. The macroscopic morphologies of all isolates were similar regardless of the medium on which they were grown. After 21 days of incubation, colonies on PDA were pale orange to gray-orange, and on CMA and oatmeal agar, they were brown to dark brown. An exception was noted in clade V and in two isolates of the clade IIa (CBS 359.36, the type strain of *S. schenckii*, and NBRC 8158), where colonies remained colorless. Since all the isolates sporulated considerably better on CMA than on other media tested and no growth differences were observed at 25 and 30°C, this culture medium, incubated at 30°C, was used to compare microscopic features among clades. Practically all the isolates developed terminal or intercalary conidial clusters on more or less differentiated conidiophores. The conidia were produced sympodially on denticulate conidiogenous cells. These conidia were hyaline or slightly pigmented, usually obovoid or pear-shaped, and mea-

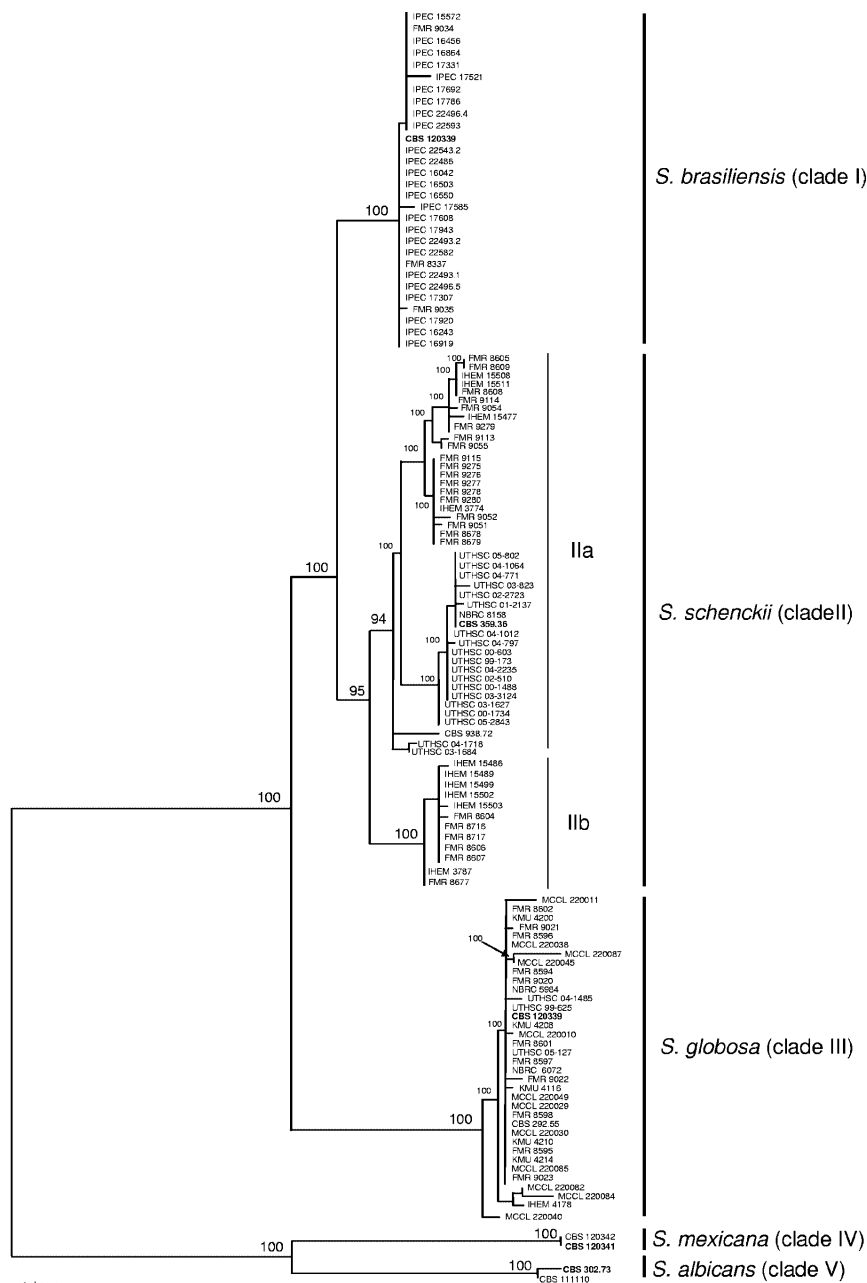


FIG. 1. One of the 5,000 most parsimonious trees obtained from heuristic searches based on analysis produced from the combined data set. Bootstrap support values above 90% are indicated at the nodes. Type strains are indicated with boldface type.

TABLE 2. Mean colony diameter of isolates of the *S. schenckii* complex on PDA at 21 days

Clade	Species	Mean colony diam (mm) ± SD at temp:			
		20°C	30°C	35°C	37°C
I	<i>S. brasiliensis</i>	24.7 ± 6.1	24.7 ± 5.5	16.6 ± 5.9	7.6 ± 1.6
IIa	<i>S. schenckii</i>	28.9 ± 5.4	36.0 ± 5.5	21.3 ± 7.0	6.1 ± 3.0
IIb	<i>S. schenckii</i>	30.1 ± 3.0	33.6 ± 3.0	20.8 ± 3.5	5.9 ± 1.6
III	<i>S. globosa</i>	28.5 ± 7.0	30.9 ± 5.0	11.5 ± 5.3	0.4 ± 0.5
IV	<i>S. mexicana</i>	53.5 ± 0.7	67.5 ± 2.1	10.8 ± 0.4	1.8 ± 0.4
V	<i>S. albicans</i>	51.0 ± 2.8	67.0 ± 4.2	28.0 ± 1.4	4.2 ± 1.4

sured 2 to 8 µm long by 1.5 to 2.5 µm wide. In addition, practically all the isolates produced another type of conidia, which were thick walled, dark brown, and usually borne individually on short denticles along the sides of the vegetative hyphae. These conidia, which are regarded as sessile conidia, measured 2 to 6 µm long by 2 to 3.5 µm wide and showed different shapes among clades. The presence or absence of these sessile conidia and their morphologies were key features to distinguish the different clades obtained in the phylogenetic analysis. Clades I and III showed globose to subglobose sessile conidia (Fig. 2A and D). Most of the isolates of clade II produced, in greater or lesser degree, triangular to cuneiform sessile conidia (Fig. 2B). Only two isolates in this clade (FMR 8677 and IHFM 3787), which were phylogenetically distinct from the rest of the isolates, showed a different type of sessile conidia, which were obovoid, elongated, or irregularly shaped (Fig. 2C). Isolates of clade IV produced subglobose, obovoidal, or ellipsoidal sessile conidia (Fig. 2E). Neither the isolates in clade V nor the two isolates in clade IIa produced pigmented sessile conidia. These conidial differences correlated with those observed for growth rate and carbohydrate assimilations mentioned above (Tables 2 and 3) and confirmed that clades I, III, IV, and V represent species that are different from *S. schenckii*. The first three clades are here proposed as new species, and clade V corresponded with *S. albicans*.

Sporothrix brasiliensis Marimon, Gené, Cano, et Guarro, sp. nov. = *Sporothrix schenckii*, clade I sensu Marimon et al. (20). Coloniae in PDA ad 30°C post 21 dies 15 vel 38 mm diametri. Augmentum fit in temperatura 37°C. Conidia sympodialia hyalina vel subhyalina, obovoidea, 2 vel 6 per 1 vel 4 µm. Conidia sessilis brunnea vel atrobrunnea, crassitunicata, plerumque globosa vel subglobosa, 2.5 vel 5 per 2 vel 3 µm. Teleomorphosis ignota. Assimilantur ribitolum variabile. Non assimilantur sucrosum et raffinum.

The colonies on PDA attained a diameter of 15 to 38 mm

TABLE 3. Physiological key characteristics for differentiating the clades of the *S. schenckii* complex

Clade	Species	% of isolates that assimilate carbon source:		
		Sucrose	Raffinose	Ribitol
I	<i>S. brasiliensis</i>	0	0	18.5
IIa	<i>S. schenckii</i>	100	100	100
IIb	<i>S. schenckii</i>	100	100	33.3
III	<i>S. globosa</i>	100	0	90.9
IV	<i>S. mexicana</i>	100	100	100
V	<i>S. albicans</i>	100	0	50

after 21 days of incubation at 30°C. Conidiogenous cells were usually terminal or intercalary on more or less differentiated conidiophores, were slightly swollen, and produced conidia sympodially on a few denticles. Sympodial conidia were usually hyaline to subhyaline, obovoidal, and 2 to 6 µm long by 1 to 4 µm wide. Sessile conidia were brown to dark brown, thick walled, globose to subglobose, and 2.5 to 5 µm long by 2 to 3 µm wide. A teleomorph was not developed by any isolate. The maximum growth temperature was 37°C (5 to 10 mm in diameter after 21 days). The fungus did not grow at 40°C and was unable to assimilate sucrose and raffinose. Variable results were seen for the assimilation of ribitol (81.5% of isolates were negative). The holotype is IMI 394469, from Rio de Janeiro, Brazil. Ex-type living cultures include CBS 120339, FMR 8309, and IPEC 16490. Etymology refers to the country of origin of the isolates.

Sporothrix globosa Marimon, Gené, Cano, et Guarro, sp. nov. = *Sporothrix schenckii*, clade III sensu Marimon et al. (20). Coloniae in PDA ad 30°C post 21 dies 18 vel 40 mm diametri. Augmentum fit in temperatura 35°C. Conidia sympodialia hyalina vel subhyalina, obovoidea, 2.5 vel 5 per 1 vel 3 µm. Conidia sessilis brunnea vel atrobrunnea, crassitunicata, plerumque globosa vel subglobosa, 3 vel 4 per 2 vel 3.5 µm. Teleomorphosis ignota. Assimilantur sucrosum et ribitolum. Non assimilantur raffinum.

The colonies on PDA attained a diameter of 18 to 40 mm after 21 days of incubation at 30°C. Conidiogenous cells were often terminal or intercalary on more or less differentiated conidiophores, were often swollen, and produced conidia sympodially on numerous denticles. Sympodial conidia were usually hyaline to subhyaline, obovoidal, and 2 to 5 µm long by 1 to 3 µm wide. Sessile conidia were brown to dark brown, thick walled, predominantly globose to subglobose, and 2.5 to 4 µm long by 2 to 3.5 µm wide. A teleomorph was not developed by any isolate. The maximum growth temperature was 35°C (2.5 to 20 mm in diameter after 21 days). All isolates were unable to grow at 37°C, with the exception of four strains, which showed a very restricted growth (up to 2 mm in diameter after 21 days). The fungus did not grow at 40°C and was unable to assimilate raffinose. Ribitol was assimilated by 90.9% of the isolates. The holotype is IMI 394470 from Zaragoza, Spain. Ex-type living cultures include CBS 120340 and FMR 8600. Etymology refers to the spherical shape of the lateral conidia.

Sporothrix mexicana Marimon, Gené, Cano, et Guarro, sp. nov. = *Sporothrix schenckii*, clade IV, from the present study. Coloniae in PDA ad 30°C post 21 dies 66 vel 69 mm diametri. Augmentum fit in temperatura 37°C. Conidia sympodialia hyalina vel subhyalina, obovoidea, 3 vel 5.5 per 2 vel

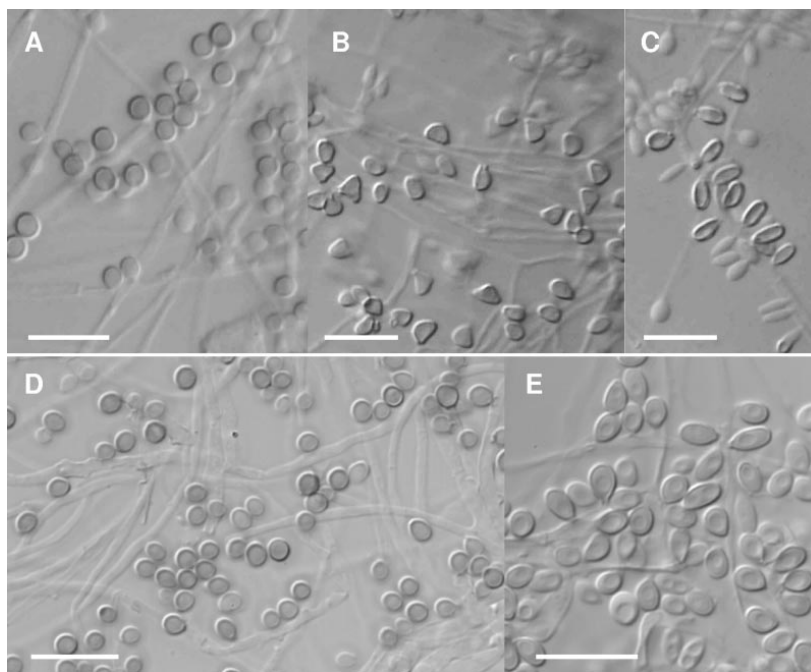


FIG. 2. Morphology of the sessile conidia of the *S. schenckii* species complex. (A) *S. brasiliensis* CBS 120339 (clade I). (B and C) *S. schenckii* (clade II) and FMR 8608 (clade IIa) (B) and FMR 8677 (clade IIb) (C). (D) *S. globosa* CBS 120340 (clade III). (E) *S. mexicana* CBS 120341 (clade IV). Bars, 10 μ m.

2.5 μ m. Conidia sessilis brunnea vel atrobrunnea, crassitunicata, subglobosa, obovoides vel ellipsoidea, 3 vel 4 per 2 vel 3.5 μ m. Teleomorphosis ignota. Assimilantur ribitolum, sucrosum, et raffinose.

The colonies on PDA attained a diameter of 66 to 69 mm after 21 days of incubation at 30°C. Conidiogenous cells were usually terminal or intercalary on more or less differentiated conidiophores, were often swollen, and were densely denticulate. Sympodial conidia were usually hyaline to subhyaline, obovoidal, and 3 to 5.5 μ m long by 2 to 2.5 μ m wide. Sessile conidia were brown to dark brown, thick walled, predominantly subglobose, obovoidal, or ellipsoidal, and 3 to 4 μ m long by 2 to 3.5 μ m wide. A teleomorph was not developed by any isolate. The maximum growth temperature was 37°C (1.5 to 2.5 mm in diameter after 21 days). The fungus did not grow at 40°C and was able to assimilate sucrose, raffinose, and ribitol. The holotype is IMI 394471 from Puebla, Mexico. Ex-type living cultures include CBS 120341 and FMR 9108. Etymology refers to the country of origin of the isolates.

DISCUSSION

Up to now, sporotrichosis, the most common subcutaneous fungal infection in South America, had been attributed to a unique species, *S. schenckii*. However, a recent molecular study demonstrated that *S. schenckii* is a complex of at least six

putative phylogenetic species (20). Indeed, something similar has occurred in many other pathogenic fungi where the use of different molecular markers has demonstrated that they are genetically more complex than was initially thought. This is the case for *Pneumocystis carinii* (1), *Coccidioides immitis* (17), *Aspergillus fumigatus* (26), *Candida parapsilosis* (29), and *Pseudallescheria boydii* (10), among others. All of them constitute species complexes that are often difficult to differentiate phenotypically but sometimes with different clinical manifestations and infecting different body sites or even different hosts.

The most useful and significant finding of the present study has been the demonstration of a clear correlation between molecular data and phenotypic features, which allowed us to differentiate three new *Sporothrix* species, two of which have been associated with human infections (*S. brasiliensis* and *S. globosa*). Another interesting aspect of this study has been to confirm that the CAL gene is a good marker for the recognition of these species. Thus, by sequencing only this one locus and including many additional strains in the analysis, we were able to obtain the same main groups as in the previous study, where we sequenced three different loci (20). In addition, the analysis of the CAL sequences was useful to demonstrate that *S. albicans*, *S. inflata*, and *S. schenckii* var. *luriei* are clearly different species from *S. schenckii*.

In order to confirm the uniqueness of the new species described here, and knowing that several ascomycetes belonging

mainly to *Ophiostoma* species can form *Sporothrix* anamorphs and that β -tubulin sequences of several of these ascomycetes are deposited in the GenBank database, we sequenced a representative isolate of each of the new species (*S. brasiliensis* AM116946, *S. globosa* AF116966, and *S. mexicana* AM498344) for comparison. In all cases, the degree of homology with the deposited sequences was very low.

Our study, to some extent, has confirmed previous molecular studies carried out by other authors, who already demonstrated high genetic variability in *S. schenckii* (13, 14, 15, 22, 32). Watanabe et al. (32), using restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of the internal transcribed spacer region, grouped 204 isolates into four types, which correlated with their geographical origins. Type I was found predominantly in Africa and America, type II was found predominantly in South America, type III was found predominantly in North America, and type IV was found predominantly in Australia and Asia. This geographical distribution is similar to that obtained here. However, in our case, the Asian isolates grouped with the European ones, forming a highly supported group, which was the basis of the newly proposed species *S. globosa*. This agrees with data from a study reported previously by Ishizaki et al. (14), who used RFLP analysis of mitochondrial DNA, where the European isolates (all from Spain) were nested in the same phylogenetic group as isolates from Korea, China, and Japan. In the *S. globosa* clade, five Chinese environmental isolates were included which had previously been identified as being *S. schenckii* isolates by mitochondrial DNA RFLP by Ishizaki et al. (15). These isolates showed the same key phenotypic features as the rest of the isolates in the clade. With the exception of the Brazilian isolates and three isolates from the United States, the rest of the American isolates were included in clade II, as in the previous study (20). This clade was the most genetically heterogeneous group and probably encompasses a few more putative phylogenetic species. However, we did not find enough phenotypic characteristics to distinguish them. This clade also included the type strain of *S. schenckii*, which was also of American origin.

The saprophytic form of *S. schenckii* is usually characterized by the two types of conidia (5, 19) described above, i.e., sessile and sympodial. While the shape of the former type of conidia is very variable (globose, subglobose, ellipsoidal, triangular, etc.) among isolates, the morphology of the latter is more constant, being more or less obovoidal in general. By examining the morphology of the sessile conidia, we found robust differences among clades, which, combined with physiological data, allowed the differentiation of some cryptic species within the set of isolates that we received as *S. schenckii*. Other authors also correlated the morphology of the sessile conidia with some physiological features when environmental isolates of *S. schenckii* were studied. For instance, strains reported previously by Mackinnon (18), which were isolated from different environmental sources, showed oval dark-pigmented conidia and multiple spicules on the hyphae after conidial detachment. These isolates grew at 37°C and were pathogenic to mice. By contrast, other environmental strains isolated previously by Howard and Orr (12) formed dark-pigmented conidia firmly attached to the hyphae. These isolates did not grow at 37°C and were nonpathogenic to mice. Mesa-Arango et al. (22) found significant differences in conidial size among several

groups generated by random amplified polymorphic DNA analysis, which coincided with different geographical locations. However, they did not indicate to what type of conidia they referred, and it is important to take into account that, in general, the sporulation of *Sporothrix* spp., especially the production of the sessile pigmented conidia, can vary considerably when routine culture media such as Sabouraud dextrose agar or PDA are used. We recommend the use of CMA for determining the microscopic features of these fungi, as the morphology remains stable when this medium is used. We were surprised by the fact that the type strain of *S. schenckii* (CBS 359.36) produced only hyaline sympodial conidia. This strain has traditionally been described as having pigmented conidia (11); however, we were unable to observe any dark, sessile conidia, and we presume that the isolate has degenerated, thereby losing its ability to produce these conidia. Isolate NBRC 8158, which is morphologically and genetically identical to the above-described isolate and of unknown origin, is probably a subculture of the type strain.

Only a few studies on the physiology of *S. schenckii* have been published. Ghosh et al. (9) previously tested 49 isolates from India, and none of them tolerated a 10% salt concentration. In contrast, approximately one-half of the isolates in our study tolerated this concentration, although isolates of *S. brasiliensis* showed the most restricted growth under these conditions. We also noticed an important discrepancy with the results reported by Ghosh et al. (9) concerning the carbohydrate assimilation tests, specifically inositol and mannitol. Both tests were negative for all the isolates tested previously by Ghosh et al. (9), while in our study, they were consistently positive. The results of assimilation studies for cellobiose, ribitol, D-galactose, D-glucose, glycerol, maltose, sorbitol, trehalose, and D-xylose were similar in both studies. Ghosh et al. (9) found variable results for the assimilation of raffinose, rhamnose, and dextrin within a given geographical area. We also found variable results for raffinose; however, all our isolates were able to assimilate rhamnose and dextrin. One explanation for these important discrepancies could lie in the fact that Ghosh et al. (9) used an auxanographic method with discs impregnated with saturated solutions of the carbohydrates on solid medium incubated at 37°C, while we used liquid media incorporated into microplates and incubated at 25°C. Although we evaluated the responses to more than 40 physiological tests, we found that only the assimilation of sucrose, raffinose, and ribitol was useful in discriminating members of the *S. schenckii* complex. Our studies are in agreement with those described previously by Dixon et al. (8) with regard to the ability of environmental isolates to grow at 35°C. The growth of all clinical isolates at 37°C was not, however, supported by our findings, as *S. globosa* failed to grow at this temperature.

In conclusion, *S. schenckii* must not be longer considered a single species. Using the procedures described here and the data reported in Table 4, the different species within the complex can be easily and reliably identified without the need for molecular techniques. As more epidemiological data become available for these species, we should gain a clear understanding of their geographic distribution, their role in disease, and the potentially different responses to antifungal agents.

TABLE 4. Summary of the key features for species differentiation

Species	Presence of sessile pigmented conidia	Colonies on PDA at 30°C exceeding 50 mm in 21 days	Growth at 37°C	Assimilation test result	
				Sucrose	Raffinose
<i>S. albicans</i>	No	Yes	Yes	+	—
<i>S. brasiliensis</i>	Yes	No	Yes	—	—
<i>S. globosa</i>	Yes	No	No	+	—
<i>S. mexicana</i>	Yes	Yes	Yes	+	+
<i>S. schenckii</i>	Yes	No	Yes	+	+

ACKNOWLEDGMENTS

We are indebted to the curators of the Centraalbureau voor Schimmelcultures (Utrecht, The Netherlands), BCCM/IHEM Biomedical Fungi and Yeasts Collection (Brussels, Belgium), A. Espinosa (Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Universidad Autónoma de Puebla, Mexico), J. M. Torres (IMIM, Hospital del Mar, Barcelona, Spain), C. Rubio (Hospital Universitario Lozano Blesa, Zaragoza, Spain), R. Negróni (Hospital de Infecciosas Francisco Javier Muñiz, Buenos Aires, Argentina), L. Trilles (Serviço de Micrologia Médica, Instituto Evandro Chagas, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil), P. Godoy (Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil), M. Paniso (Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel, Caracas, Venezuela), C. Hartung (Instituto de Medicina Tropical, Caracas, Venezuela), and A. Chakrabarti (Center for Advance Research in Medical Mycology, Chandigarh, India) for supplying many of the strains used in the study.

This study was supported by the Spanish Ministerio de Ciencia y Tecnología, grant CGL 2005-07394.

REFERENCES

1. Beard, C. B., J. L. Carter, S. P. Keely, L. Huang, N. J. Pieniazek, I. N. Moura, J. M. Roberts, A. W. Hightower, M. S. Bens, A. R. Freeman, S. Lee, J. R. Stringer, J. S. Duchin, C. del Rio, D. Rimland, R. P. Baughman, D. A. Levy, V. J. Dietz, P. Simon, and T. R. Navin. 2000. Genetic variation in *Pneumocystis carinii* isolates from different geographic regions: implications for transmission. *Emerg. Infect. Dis.* 6:265–272.

2. Berbee, M. L., and J. W. Taylor. 1992. 18S ribosomal RNA gene sequence characters place the human pathogen *Sporothrix schenckii* in the genus *Ophiostoma*. *Exp. Mycol.* 16:87–91.

3. da Rosa, A. C., M. L. Scrofernecker, R. Vettorato, R. L. Gervini, G. Vettorato, and A. Weber. 2005. Epidemiology of sporotrichosis: a study of 304 cases in Brazil. *J. Am. Acad. Dermatol.* 52:451–459.

4. de Beer, Z. W., T. C. Harrington, H. F. Vismer, B. D. Wingfield, and M. J. Wingfield. 2003. Phylogeny of the *Ophiostoma stenoceras*-*Sporothrix schenckii* complex. *Mycologia* 95:434–441.

5. de Hoog, G. S. 1974. The genera *Blastobotrys*, *Sporothrix*, *Calcarisporium* and *Calcarisporiella* gen. nov. *Stud. Mycol.* 7:1–84.

6. de Hoog, G. S., J. Guarro, J. Gené, and M. J. Figueras. 2000. Atlas of clinical fungi, 2nd ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands.

7. de Hoog, G. S., F. D. Marvin-Sikkema, G. A. Lahpoor, J. C. Gottschall, R. A. Prins, and E. Guého. 1994. Ecology and physiology of the emerging opportunistic fungi *Pseudallescheria boydii* and *Scedosporium prolificans*. *Mycoses* 37:71–78.

8. Dixon, D. M., I. F. Salkin, R. A. Duncan, N. J. Hurd, J. H. Haines, M. E. Kemna, and F. B. Coles. 1991. Isolation and characterization of *Sporothrix schenckii* from clinical and environmental sources associated with the largest U.S. epidemic of sporotrichosis. *J. Clin. Microbiol.* 29:1106–1113.

9. Ghosh, A., P. K. Maity, B. M. Hemashettar, V. K. Sharma, and A. Chakrabarti. 2002. Physiological characters of *Sporothrix schenckii* isolates. *Mycoses* 45:449–454.

10. Gilgado, F., J. Cano, J. Gené, and J. Guarro. 2005. Molecular phylogeny of the *Pseudallescheria boydii* species complex: proposal of two new species. *J. Clin. Microbiol.* 43:4930–4942.

11. Hektoen, L., and C. F. Perkins. 1900. Refractory subcutaneous abscesses caused by *Sporothrix schenckii*. A new pathogenic fungus. *J. Exp. Med.* 5:77–89.

12. Howard, D. H., and G. F. Orr. 1963. Comparison of strains of *Sporothrix schenckii* isolated from nature. *J. Bacteriol.* 85:816–821.

13. Ishizaki, H., M. Kawasaki, M. Aoki, T. Matsumoto, A. A. Padhye, M. Mendoza, and R. Negróni. 1998. Mitochondrial DNA analysis of *Sporothrix schenckii* in North and South America. *Mycopathologia* 142:115–118.

14. Ishizaki, H., M. Kawasaki, M. Aoki, S. Wu, J. Lin, J. A. Kim, Y. H. Won, and C. R. Calvo. 2004. Mitochondrial DNA analysis of *Sporothrix schenckii* from China, Korea and Spain. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi* 45:23–25.

15. Ishizaki, H., M. Kawasaki, M. T. Mochizuki, X. Z. Jin, and S. Kagawa. 2002. Environmental isolates of *Sporothrix schenckii* in China. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi* 43:257–260.

16. Johnson, E. M., A. Szekeley, and D. W. Warnock. 1998. In-vitro activity of voriconazole, itraconazole and amphotericin B against filamentous fungi. *J. Antimicrob. Chemother.* 42:741–745.

17. Koufopanou, V., A. Burt, T. Szaro, and J. W. Taylor. 2001. Gene genealogies, cryptic species and molecular evolution in the human pathogen *Coccidioides immitis* and relatives (Ascomycota, Onygenales). *Mol. Biol. Evol.* 18:1246–1258.

18. Mackinnon, J. E. 1970. Ecology and epidemiology of sporotrichosis, p. 169–181. In *Proceedings of the International Symposium on Mycoses*. Pan American Health Organization, Washington, DC.

19. Mariat, F., P. Lavalle, and P. Destombes. 1962. Recherches sur la Sporotrichose. Etude mycologique et puvior pathogene de souches Mexicaines de *Sporothrix schenckii*. *Sabouraudia* 2:60–79.

20. Marimon, R., J. Gené, J. Cano, L. Trilles, M. Dos Santos Lazera, and J. Guarro. 2006. Molecular phylogeny of *Sporothrix schenckii*. *J. Clin. Microbiol.* 44:3251–3256.

21. McGinnis, M. R., N. Nordoff, R. K. Li, L. Pasarell, and D. W. Warnock. 2001. *Sporothrix schenckii* sensitivity to voriconazole, itraconazole and amphotericin B. *Med. Mycol.* 39:369–371.

22. Mesa-Arango, A. C., M. R. Reyes-Montes, A. Pérez-Mejía, H. Navarro-Barranco, V. Souza, G. Zúñiga, and C. Toriello. 2002. Phenotyping and genotyping of *Sporothrix schenckii* isolates according to geographic origin and clinical form of sporotrichosis. *J. Clin. Microbiol.* 40:3004–3011.

23. Neyra, E., P. Fonteyne, D. Swinne, F. Fauche, B. Bustamante, and N. Noland. 2005. Epidemiology of human sporotrichosis investigated by amplified fragment length polymorphism. *J. Clin. Microbiol.* 43:1348–1352.

24. O'Donnell, K. 2000. Molecular phylogeny of the *Nectria haematococca*-*Fusarium solani* species complex. *Mycologia* 92:919–938.

25. O'Reilly, L. C., and S. A. Altman. 2006. Macrorestriction analysis of clinical and environmental isolates of *Sporothrix schenckii*. *J. Clin. Microbiol.* 44:2547–2552.

26. Pringle, A., D. M. Baker, J. L. Platt, J. P. Wares, J. P. Latge, and J. W. Taylor. 2005. Cryptic speciation in the cosmopolitan and clonal human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. *Evolution* 59:1886–1899.

27. Suzuki, K., M. Kawasaki, and H. Ishizaki. 1988. Analysis of restriction profiles of mitochondrial DNA from *Sporothrix schenckii* and related fungi. *Mycopathologia* 103:147–151.

28. Swofford, D. L. 2001. PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (* and other methods) (version 4.0). Sinauer Associates, Sunderland, MA.

29. Tavanti, A., A. D. Davidson, N. A. R. Gow, and M. C. J. Maiden. 2005. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *J. Clin. Microbiol.* 43:284–292.

30. Travassos, L. R., and K. O. Lloyd. 1980. *Sporothrix schenckii* and related species of *Ceratocystis*. *Microbiol. Rev.* 44:683–721.

31. Trilles, L., B. Fernández-Torres, M. Dos Santos Lazera, B. Wanke, A. de Oliveira Schubach, R. de Almeida Paes, I. Inza, and J. Guarro. 2005. In vitro antifungal susceptibilities of *Sporothrix schenckii* in two growth phases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:3952–3954.

32. Watanabe, S., M. Kawasaki, T. Mochizuki, and H. Ishizaki. 2004. RFLP analysis of the internal transcriber spacer regions of *Sporothrix schenckii*. *Jpn. J. Med. Mycol.* 45:165–175.

33. Yarrow, D. 1998. Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts, p. 95–96. In C. P. Kurtzman, and J. W. Fell (ed.), *The yeasts, a taxonomic study*, 4th ed. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.

34. Zhang, Z., X. Liu, G. Yang, X. Gao, L. Jin, and L. An. 2006. Genotyping of *Sporothrix schenckii* by analysis of ribosomal DNA regions. *Mycoses* 49:305–310.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

FILOGÈNIA MOLECULAR I CARACTERITZACIÓ FENOTÍPICA DEL COMPLEX D'ESPÈCIES DE
SPOROTHRIX SCHENCKII

Rita Marimón Picó

ISBN: 978-84-691-1554-1 /DL:T.147-2008

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
FILOGÈNIA MOLECULAR I CARACTERITZACIÓ FENOTÍPICA DEL COMPLEX D'ESPÈCIES DE
SPOROTHRIX SCHENCKII
Rita Marimón Picó
ISBN: 978-84-691-1554-1 /DL:T.147-2008

ANNEX 4

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

FILOGÈNIA MOLECULAR I CARACTERITZACIÓ FENOTÍPICA DEL COMPLEX D'ESPÈCIES DE
SPOROTHRIX SCHENCKII

Rita Marimón Picó

ISBN: 978-84-691-1554-1 /DL:T.147-2008

**In vitro antifungal susceptibilities of 5 species of
*Sporothrix***

Rita Marimon, Carolina Serena, Josepa Gené, Josep Cano and Josep Guarro*

Unitat de Microbiologia, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira
i Virgili, Reus, Spain.

* Corresponding author. Mailing address: Unitat de Microbiologia, Facultat de
Medicina, Universitat Rovira i Virgili. Carrer Sant Llorenç, 21.43201 Reus, Spain.
Phone 977-759359. Fax: 977-759322. E-mail: josep.guarro@urv.cat

ABSTRACT

Ninety-two isolates belonging to 5 species of the *Sporothrix schenckii* complex were tested in vitro against twelve antifungal agents, using a reference microdilution method. There were significant differences among the species, *Sporothrix brasiliensis* was the species that showed the best response to antifungals that and *S. mexicana* the worst. In general, terbinafine was the most active drug, followed by ketoconazole and posaconazole.

Sporotrichosis is a worldwide subacute or chronic infection caused by the dimorphic fungus *Sporothrix schenckii*, affecting both animals and humans. This disease is characterized by nodular cutaneous and subcutaneous lesions, which may involve the adjacent lymphatic system, (2,18). A saturated solution of potassium iodide has been used as an effective therapy for localized sporotrichosis. Other drugs commonly used are itraconazole (ITC) for the treatment of lymphocutaneous infections (1,11,20), and amphotericin B (AMB) for severe infections or when ITC therapy fails (9). Although these drugs are generally effective, the long duration of therapy and the toxicity of AMB make it necessary to explore new alternatives for the treatment of severe infections.

Some in vitro studies have demonstrated variable results among the strains tested, and some authors have concluded that antifungal susceptibility is strain-dependent (7, 14, 21). This could be explained by the fact that *S. schenckii* does not represent a single species; instead it is a complex of cryptic species. Recently using a multilocus sequence analysis we have demonstrated that at least 6 phylogenetic species are included in the complex (13), several of these species being phenotypically characterized (12). Since the antifungal susceptibility of these species is unknown, we have evaluated the in vitro activity of 12 drugs against the mycelial phase of 92 strains representing 5 species of the complex (Table 1) using a reference microdilution method (15). The isolates were selected trying to represent a wide variety of geographic regions.

The isolates tested in this study were stored on potato dextrose agar plates (PDA; Difco Laboratories, Detroit, Mich.) covered with paraffin oil, subcultured on PDA and incubated at 30°C for 5 to 6 days. *Candida krusei* ATCC 6258 and *C. parapsilosis* ATCC 22019 were used as control strains.

Antifungal agents were obtained as pure powders. AMB (USP, Rockville, MD), ITC and ketoconazole (KTC) (Janssen Pharmaceutica, Beerse, Belgium), albaconazole (ABC) (J. Uriach & Cía, Barcelona, Spain), voriconazole (VRC) (Pfizer Inc., NY, USA), posaconazole (PSC) (Schering-Plough, Kenilworth, USA), ravuconazole (RVC) (Bristol-Myers Squibb Company, New Brunswick, NJ), eberconazole (EBC) (Laboratorios Salvat, S. A., Barcelona, Spain) and terbinafine (TRB) (Novartis, Basel, Switzerland) were diluted in dimethyl sulfoxide (Panreac Química S.A., Barcelona, Spain), and micafungin (MFG) (Astellas Pharma Inc., Tokyo, Japan), flucytosine (5FC) (Sigma-Aldrich corp., St. Louis, U.S.A.) and fluconazole (FLC) (Pfizer Inc., Madrid, Spain) in sterile distilled water. Microplates were prepared as described in the document M38-A (15). Final drug concentrations ranged from 128 to 0.25 µg/ml for MFG, from 64 to 0.12 µg/ml for FLC and 5FC, and from 16 to 0.03 µg/ml for the other drugs. The inoculum was prepared as recommended by the CLSI (15). The inocula were prepared by flooding the surface of the agar plate with sterile saline, scraping the sporulating mycelium with a culture loop, and drawing up the resultant suspension with a sterile Pasteur pipette. The suspensions were then filtered once through sterile gauze to remove hyphae. The number of conidia in the suspension were adjusted to an optical density that ranged from 0.09 to 0.11, which

correspond to a final concentration of 1×10^4 to 5×10^4 CFU/ml. The viability of these inocula was verified by plating dilutions of the suspension on PDA plates. The microplates were incubated at 30°C and read at 72 h. The MIC endpoint for the triazoles, AMB and MFG was defined as the lowest concentration that produced complete inhibition of growth, and for FLC, KTC, and 5FC as the lowest concentration that produced the 50% of inhibition growth. Approximately 80% of the tests were repeated, and in general they showed the same tendency (data not shown), only those that showed different results were repeated and the most common value was scored.

Results are shown in Table 1. MICs for the control strains were in agreement with the CLSI guidelines (15). TRB was the most active drug showing a geometric mean (GM) MICs of 0.23 µg/ml for all the strains tested, followed by KTC with a GM MIC of 0.84 µg/ml. However, this latter drug was less active against *S. mexicana* (GM MIC of 4 µg/ml) and *S. albicans* (GM MIC of 3.2 µg/ml) than against the other species of the complex. The activity of KTC was more variable than that of TRB and depended on the species tested. PSC was the third most active antifungal drug tested with a total GM MIC of 1.59 µg/ml and the most active of the drugs for systemic use.

Although we could only test two isolates of *S. mexicana*, this was the species with higher MICs; and only TRB showed relative low MICs (0.5 µg/ml) against this species.

FLC and MFG were not active against any of the isolates tested, as had already been demonstrated previously by other authors (21, 11). VRC

showed poor activity, in agreement with McGinnis *et al.* (14), who also obtained a high GM MIC (6.50 µg/ml) against strains of *S. schenckii*.

RVC and ITC only showed good activity against *S. brasiliensis*, whereas for the other species tested both drugs showed high MIC values. Other authors (14) had also demonstrated poor in vitro activity of ITC. Despite these in vitro results, ITC has generally shown efficacy in the clinical setting. Conti Diaz *et al.* (1) successfully treated with this drug 18 patients with cutaneous sporotrichosis. Sharkey-Mathis *et al* (20) reported that 11 out of 15 (83%) patients with osteoarticular sporotrichosis who received ITC responded to the therapy.

In the present work, TRB has shown high activity against all the species tested. However, the therapeutic potential of TRB has only been confirmed for cutaneous and lymphocutaneous sporotrichosis (5,6,17,19). By contrast, this drug has not demonstrated efficacy in the treatment of systemic sporotrichosis in a murine model (8). In severe or systemic infections PSC constitutes a promising therapeutic agent since in vitro it has worked better than AMB and ITC at least against the strains of *S. brasiliensis*, *S. albicans* and *S.schenckii*. Further in vivo studies are needed to confirm this activity.

Although in vitro results do not always correlate with in vivo outcome, none of the drugs tested showed activity against *S. mexicana* and *S. globosa*. It would be interesting to know if any drug combinations exert any activity against such species. However, no data are so far available on the activity of combined drugs against *S. schenckii sensu lato*.

In recent years, application of the phylogenetic species concept in different biological species of pathogenic moulds has revealed different lineages that reflected species divergence (3,10,16). The delineation of these phylogenetic groups and development of easy methods for their identification is crucial since they can show different pathological behaviour and different antifungal response (4). This study has demonstrated that *S. schenckii* constitutes a clear example of the latter.

Since clinical information on these new species not yet exists the significance of our findings is unknown. However, it seems that proper identification of the species of the *S. schenckii* complex involved in a given infection could be important for the appropriate treatment. For instance, in the case of a systemic infection, if the species causing the infection was *S. mexicana* it is likely that the response to the treatment with ITC or PSC would be poorer than if the species was *S. brasiliensis*.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are indebted to the curators of the Centraalbureau voor Schimmelcultures (Utrecht, Netherlands), BCCM™/IHEM Biomedical Fungi and Yeasts Collection (Brussels, Belgium), A. Espinosa (Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Universidad Autónoma de Puebla, Mexico), J. M. Torres (IMIM, Hospital del Mar, Barcelona, Spain), C. Rubio (Hospital Universitario Lozano Blesa, Zaragoza, Spain), R. Negróni

(Hospital de Infecciosas Francisco Javier Muñiz, Buenos Aires, Argentina), L. Trilles (Serviço de Micologia Médica, Instituto Evandro Chagas, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil), P. Godoy (Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, Brazil), M. Kawasaki (Department of Dermatology, Kanazawa Medical University, Ishikawa, Japan) and D. A. Sutton (Department of Pathology, University of Texas Health Science Center, San Antonio, TX, USA) for supplying many of the strains used in the study. This study was supported by the Spanish Ministerio de Ciencia y Tecnología, grants CGL 2004-00425/BOS and CGL 2005-07394.

REFERENCES

1. **Conti, I. A., E. Civila, and E. Gezuele.** 1992. Treatment of human cutaneous sporotrichosis with itraconazole. *Mycoses* **35**:153-156.
2. **De Araujo, T., A. C. Marques, and F. Kerdel.** 2001. Sporotrichosis. *Int. J. Dermatol.* **40**:737-742.
3. **Gilgado, F., J. Cano, J. Gené, and J. Guarro.** 2005. Molecular phylogeny of the *Pseudallescheria boydii* species complex: proposal of two new species. *J. Clin. Microbiol.* **43**:4930-4942.
4. **Gilgado, F., C. Serena, J. Cano, J. Gene, and J. Guarro.** 2006. Antifungal susceptibilities of the species of the *Pseudallescheria boydii* complex. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**:4211-4213.

5. **Hay, R. J.** 1999. Therapeutic potential of terbinafine in subcutaneous and systemic mycoses. *Br. J. Dermatol.* **141**(Suppl. 56):36-40.
6. **Jessup, C. J., N. S. Ryder, and M. A. Ghannoum.** 2000. An evaluation of the *in vitro* activity of terbinafine. *Med. Mycol.* **38**:155-159.
7. **Johnson, E. M., A. Szekely, and D. W. Warnock.** 1998. In-vitro activity of voriconazole, itraconazole and amphotericin B against filamentous fungi. *J. Antimicrob. Chemother.* **42**:741-745.
8. **Kan, V. L., and J. E. Bennett.** 1988. Efficacies of four antifungal agents in experimental murine sporotrichosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **32**:1619-1623.
9. **Kauffman, C., R. Hajjeh, and W. Chapman.** 2000. Practice guidelines for the Management of Patients with Sporotrichosis *Clin. Infect. Dis.* **30**:684-687.
10. **Koufopanou, V., A. Burt, T. Szaro, and J. W. Taylor.** 2001. Gene genealogies, cryptic species, and molecular evolution in the human pathogen *Coccidioides immitis* and relatives (Ascomycota, Onygenales). *Mol. Biol. Evol.* **18**:1246-1258.
11. **Lortholary, O., D. W. Denning, and B. Dupont.** 1999. Endemic mycoses: a treatment update. *J. Antimicrob. Chemother.* **43**:321-331.
12. **Marimon, R., Cano, J., Gené, J., Sutton D. A., Kawasaki, M. and J. Guarro.** 2007. Three new *Sporothrix* species of clinical

interest: *S. brasiliensis*, *S. globosa* and *S. mexicana*. J. Clin. Microbiol., in-press.

13. **Marimon, R., J. Gené, J. Cano, L. Trilles, M. Dos Santos Lazera, and J. Guarro.** 2006. Molecular phylogeny of *Sporothrix schenckii*. J. Clin. Microbiol. 44:3251-3256.
14. **McGinnis, M. R., N. Nordoff, R. K. Li, L. Pasarell, and D. W. Warnock.** 2001. *Sporothrix schenckii* sensitivity to voriconazole, itraconazole and amphotericin B. Med. Mycol. **39**:369-371.
15. **National Committee for Clinical Laboratory Standards.** 2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard M38-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
16. **O'Donnell, K.** 2000. Molecular phylogeny of the *Nectria haematococca-Fusarium solani* species complex. Mycologia **92**:919-938.
17. **Pérez, A.** 1999. Terbinafine: broad new spectrum of indications in several subcutaneous and systemic and parasitic diseases. Mycoses **42**(Suppl. 2):111-114.
18. **Rippon, J. W.** 1988. Sporothrichosis, p 277-302. In J. W. Rippon (ed.), Medical mycology. The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes, 3rd ed. The W.B. Saunders Company, Philadelphia, Pa.
19. **Ryder, N. S.** 1999. Activity of terbinafine against serious fungal pathogens. Mycoses **42**(Suppl. 2):115-119.

20. **Sharkey-Mathis, P. K., C. A. Kauffman, J. R. Graybill, D. A. Stevens, T. S. Hostetler, G. Cloud, and W. E. Dismukes.** 1993. Treatment of sporotrichosis with itraconazole. *Am. J. Med.* **95**:279-285.
21. **Trilles L., B. Fernandez-Torres, M. Dos Santos Lazera, B. Wanke, A. de Oliveira Schubach, R. de Almeida Paes, I. Inza, and J. Guarro** 2005. In vitro antifungal susceptibilities of *Sporothrix schenckii* in two growth phases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:3952-3954.

Table 1. Antifungal activities of conventional and new antifungal drugs against 90 isolates belong to species of S. schenckii complex.

Fungus (n° isolates tested)	MIC (µg/mg)	AMB	FLC	ITC	VRC	RVC	PSC	ABC	EBC	MFG	TRB	KTC	5FC
S.brasilensis (23)	Range	1-4	128	0.5-2	0.5-16	0.06-2	0.25-1	0.25-4	0.06-1	256	0.06-0.25	0.06-0.5	2-128
	GM ^a	1.67	128	0.7	3.88	0.44	0.62	1.13	0.26	256	0.09	0.15	14.49
	50% ^b	2	128	0.5	4	0.5	0.5	1	0.25	256	0.06	0.125	16
	90% ^c	4	128	1	8	1	1	4	1	256	0.25	0.25	128
S. schenckii (34)	Range	0.5-4	128	1-32	2-32	0.5-32	0.5-16	1-32	0.25-8	256	0.06-0.5	0.125-4	4-128
	GM	2.57	128	4	17.4	6.63	1.75	13.3	1.87	256	0.22	1	15.3
	50%	4	128	4	32	8	1	16	2	256	0.25	1	16
	90%	4	128	32	32	16	8	32	8	256	0.5	2	128
S.globosa (17)	Range	2-8	128	1-32	16-32	2-16	1-16	2-16	0.5-4	256	0.06-1	0.25-2	16-128
	GM	4.2	128	8.33	27.2	8	3.13	11.02	2.26	256	0.25	1.04	51.53
	50%	4	128	32	32	8	2	16	2	256	0.25	1	64
	90%	8	128	32	32	16	8	16	4	256	0.5	2	128
S.mexicana (2)	Range	16-32	128	32	16-32	32	32	32	32	256	0.5	4	128
	GM	20.16	128	32	32	32	32	32	32	256	0.5	4	128
S. albicans (16)	Range	2-8	128	32	4-32	8-32	1-2	8-32	2-16	256	0.25-4	2-8	128
	GM	5.18	128	32	11.8	19.03	1.91	18.38	9.51	256	0.8	3.2	128
	50%	4	128	32	8	16	2	16	8	256	0.5	4	128
	90%	8	128	32	32	32	2	32	16	256	4	4	128
Total (92)	Range	0.5-32	128	0.5-32	0.5-32	0.06-32	0.25-16	0.25-32	0.06-32	256	0.06-4	0.06-8	1-128
	GM	3.1	128	4.65	13.2	4.6	1.59	7.58	1.84	256	0.23	0.84	30.48
	50%	4	128	2	16	8	1	16	2	256	0.25	1	32
	90%	8	128	32	32	16	8	32	16	256	0.5	4	128

^a GM, geometric mean; ^b 50%, MIC at which 50% of the isolates were inhibited; ^c 90%, MIC at which 90% of the isolates were inhibited.
80% of the tests were repeated.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
FILOGÈNIA MOLECULAR I CARACTERITZACIÓ FENOTÍPICA DEL COMPLEX D'ESPÈCIES DE
SPOROTHRIX SCHENCKII
Rita Marimón Picó
ISBN: 978-84-691-1554-1 /DL:T.147-2008

ANNEX 5

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

FILOGÈNIA MOLECULAR I CARACTERITZACIÓ FENOTÍPICA DEL COMPLEX D'ESPÈCIES DE
SPOROTHRIX SCHENCKII

Rita Marimón Picó

ISBN: 978-84-691-1554-1 /DL:T.147-2008

***Sporothrix luriei* a rare fungus from clinical origin**

RITA MARIMON, JOSEPA GENÉ*, JOSEP CANO and JOSEP GUARRO

*Unitat de Microbiologia, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira
i Virgili, Reus, Spain*

Corresponding author. Mailing address: Unitat de Microbiologia, Departament de
Ciències Mèdiques Bàsiques, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat
Rovira i Virgili, Carrer Sant Llorenç 21, 43201-Reus, Tarragona, Spain. Phone: 34
977759341. Fax: 34 977759322. E-mail: josepa.gene@urv.cat

- ✦ *Sporotrichum schenckii* var. *beaumannii* (Matr. i Ramond) C.W. Dodge, (1935)
- ✦ *Sporotrichum schenckii-beurmannii* Greco, Argentina Med. 45: 699 (1907)
- ✦ *Sporotrichum tropicale* Panja, Dey i Ghosh, Indian med. Gaz. 82: 202 (1947)
- ✦ *Sporotrichum verticilloides* Sartory, R. Sartory i J. Mey., Compte rendu hebdomadaire des Sciences de l'Academie des sciences, Paris (1935)
- ✦ *Trichosporum beurmannii* (Matr. i Ramond) M.L. Lutz i Splend., Annali Ig. sper. (1907)

A la vegada l'any 1969 Ajello i Kaplan van descriure la única varietat actualment coneguda d'aquesta espècie, *S. schenckii* var *luriei* Ajello i Kaplan (1969), en base a la clínica i a diferents trets morfològics (veure apartat 1.1.2).

1.1.2 Característiques morfològiques

Tal i com s'ha mencionat a l'inici de la introducció, *S. schenckii* és un fong dimòrfic. D'acord al "Dictionary of fungi" s'entén com a dimòrfic, aquell fong que té dues formes, la de llevat i la miceliar (Kirk *et al.* 2001). *S. schenckii* no és l'únic patògen que té aquesta capacitat (Howard 1961); hi ha patògens primaris per a l'home que pertanyen a diferents grups taxonòmics i que també són fongs dimòrfics, entre ells podem citar a *Histoplasma capsulatum* Darling o *Coccidioides immitis* G.W. Stiles dins els Onigenals, o *Penicillium marneffeii* Segretain als Eurotials, fins i tot algun zigomicet que com *Mucor rouxii* (Calmette) Wehmer, creix en forma de llevat en unes condicions ambientals determinades (Haidle i Storck 1966). Això fa pensar que el dimorfisme més que ser un caràcter exclusiu d'un determinat grup de fongs és una adaptació d'aquests a les diferents condicions ambientals. La fase miceliar, o també anomenada fase saprofítica, de tots aquests fongs, és la que s'acostuma a trobar a la natura creixent com a mers colonitzadors sobre diferents substrats, principalment vegetals com és el cas d'*S. schenckii*. En canvi, al trobar-se en condicions

based mainly on the presence in tissue of the large, thick-walled cells with an "eyeglass" configuration typical of *S. schenckii* var. *lurie* and confirmed as belonging to *S. schenckii* by a fluorescent-antibody specific reagent in two cases [7, 9]. Cultures were only apparently obtained in one of these three cases [8], although they were not preserved. Up to now, no more reports on the presence of this fungus have been published. Considering the peculiar features of *S. schenckii* var. *lurie* and that it is a very poorly known pathogenic fungus, we have molecularly and phenotypically studied the only available strain that exists (CBS 937.72) in order to determine whether it can be considered as a different species from those of the *S. schenckii* complex.

In order to perform a phylogenetic analysis of representative strains of the different species of *Sporothrix*, we have amplified and sequenced the chitin synthase (CHS), β -tubulin (Bt2) and calmodulin (CAL) genes of the strain CBS 937.72, following the procedure described in Marimon et al. (4), and have withdrawn numerous sequences from the GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>) (Table 1). With the primers used, we were able to amplify and sequence 304 bp, 452 bp and 685 bp of the CHS, Bt2 and CAL loci, respectively. The combined data set of these characters was tested for incongruence with the partition homogeneity test as implemented in PAUP*, version 4.0b10 [10]. The result showed that the three locus sequence data sets were congruent ($P=0.79$) and could therefore be combined. A total of 9 most parsimonious trees were produced from a heuristic search using the combined data set of the 1441 nucleotides

sequenced. From these characters, 1079 were constant, 276 were parsimony informative, and 86 were variably parsimony noninformative. All phylogenetic trees (Fig. 1) showed two main clades which were 100% statistically supported. The first was split into four subclades, three corresponding to each of the species *S. brasiliensis*, *S. globosa* and *S. schenckii*, and a fourth basal subclade that included only the isolate of *S. schenckii* var. *luriei*. The second main clade encompassed two subclades, one corresponding to *S. albicans* and the other to *S. mexicana*. This clear genetic separation of *S. schenckii* var. *luriei* from the other isolates of *S. schenckii* was already shown in a previous phylogenetic study based on the analysis of ITS sequences [3]. Table 2 shows the main differences among the sequences of the type strains of the *Sporothrix* species included in the present study.

To study the macroscopic features of the strain CBS 937.72, it was subcultured on potato dextrose agar (PDA, Difco), corn meal agar (CMA; 30 g corn, 15 g agar, 1 L tap water) and oat-meal agar (OA; 30 g oat flakes, 1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.5 g KH_2PO_4 , 15 g agar, 1 L tap water) in the dark for 21 days at 30°C. The microscopic characteristics were determined from CMA slide cultures after 10-12 days at 30°C, according to the procedure of Marimon et al. [5]. In general, the colonies were very similar to those described by Ajello and Kaplan [6]. They were moist, with scarce aerial mycelium, and cream coloured, being light tan at the centre (Fig. 2 A). The conidia were borne sympodially and formed clusters usually at the end of simple conidiophores (Fig. 2 B, C), or borne individually along the sides of

the vegetative hyphae (sessile conidia) (Fig. B, D). All the conidia were hyaline, usually narrowly obovate and measured 4 to 10 μm long by 1 to 2 μm wide. All these morphological features, but especially the presence of these very long conidia, allow us to differentiate this isolate from the current *Sporothrix* species. In addition, sessile dark-pigmented conidia, typical of the *S. schenckii* species complex, are absent in this fungus. Similar to Padhye et al. [9], we did not observe pigmented sclerotium-like structures described in the original description of *S. schenckii* var. *luriei* [6]. It is likely that this fungus has lost the ability to form such structures after repeated subcultures or due to the conditions of its preservation.

Apart from genetically, the species of the *S. schenckii* complex can be also differentiated on the basis of their response to temperature and assimilation tests profiles [5]. *S. schenckii* var. *luriei* showed an optimal growth at 30°C (51 mm diam on PDA after 21 days) and was unable to grow at 40°C. This isolate grew more quickly at 35°C and 37°C than the other species of the complex. It was able to assimilate ribitol and unable to assimilate sucrose and raffinose. These tests were also useful for the differentiation of this fungus from the other species of the *Sporothrix*.

The antifungal susceptibility of the fungus to ten antifungal drugs was tested by a microdilution method, following the guidelines of the CLSI for moulds [11]. The minimal inhibitory concentrations (in $\mu\text{g/ml}$) were as follows, terbinafine 0.25; posaconazole 0.5; flucytosine, ketoconazole and itraconazole 1; amphotericin B 2; albaconazole 16; fluconazole 128; and

micafungin 256. Terbinafine was the most active drug, in agreement with Trilles et al. [12], followed by posaconazole.

On the basis of these results, we propose that *S. schenckii* var *luriei* be elevated to the level of species in the new combination *Sporothrix luriei* (Ajello & Kaplan) Marimon, Gené, Cano & Guarro comb. nov. The type strain of *S. luriei* remains CBS 937.72, and the description for *S. luriei* is the same as the original description given for *S. schenckii* var. *luriei* [6]

Key features distinguishing this species from the other members of the *S. schenckii* complex are given in the dichotomous key given below.

Key to species of the *Sporothrix schenckii* complex

1. Sucrose assimilation negative2
 Sucrose positive.....3
2. Colonies on PDA at 35°C not exceeding 30 mm diam. in 21 days;
 presence of pigmented sessile conidia; sympodial conidia
 2 to 6 µm long *S. brasiliensis*
 Colonies on PDA at 35°C exceeding 30 mm diam. in 21 days; absence of
 pigmented sessile conidia; sympodial conidia 4 to 10 µm long ... *S. luriei*
3. Colonies on PDA at 30°C exceeding 50 mm diam. in 21 days4
 Colonies on PDA at 30°C not exceeding 50 mm diam. in 21 days5
4. Raffinose assimilation positive; colonies on CMA brown
 in 2 weeks..... *S. mexicana*
 Raffinose negative; colonies remained colorless *S. albicans*
5. Raffinose assimilation negative; maximum growth at 35°C;
 sessile conidia globose or subglobose..... *S. globosa*
 Raffinose positive; maximum growth at 37°C; sessile conidia
 predominantly otherwise *S. schenckii*

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the Spanish Ministerio de Ciencia y Tecnología, grants CGL 2004-00425/BOS and CGL 2005-07394.

REFERENCES

1. Marimon R, Gené J, Cano J, Trilles L, Dos Santos Lazera M, Guarro J. Molecular phylogeny of *Sporothrix schenckii*. *J Clin Microbiol* 2006; **44**: 3251-3256.
2. O'Reilly LC, Altman SA. Macrorestriction analysis of clinical and environmental isolates of *Sporothrix schenckii*. *J Clin Microbiol* 2006; **44**: 2547-2552.
3. Watanabe S, Kawasaki M, Mochizuki T, Ishizaki H. RFLP analysis of the internal transcribed spacer regions of *Sporothrix schenckii*. *Jp J Med Mycol* 2004; **45**:165-175.
4. Zhang Z, Liu X, Yang G, Gao X, Jin L, An L. Genotyping of *Sporothrix schenckii* by analysis of ribosomal DNA regions. *Mycoses* 2006; **49**: 305-310.
5. Marimon R, Cano J, Gené J, Sutton DA, Kawasaki M, Guarro J. *S. brasiliensis*, *S. globosa* and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* species of clinical interest. *J Clin Microbiol* 2007; **45**: 3198-3206.
6. Ajello L, Kaplan W. A new variant of *Sporothrix schenckii*. *Mykosen* 1969; **12**: 633-644.

7. Alberici F, Paties CT, Lombardi G, Ajello L, Kaufman L, Chandler F.
Sporothrix schenckii var. *luriei* as the cause of sporotrichosis in Italy.
Eur J Epidemiol 1989; **5**:173-177.
8. Mercadal-Peyrí J, Bassas-Grau M, Sans-Macaró J, De Martín-Gassó C,
Mercadal-Peyrí JO. Two very rare clinical diseases in our climate:
cutaneous actinomycoses and blastomycosis of a vegetating type.
Mycopathol Mycol Appl 1965; **27**: 68-74.
9. Padhye AA, Kaufman L, Durry E, Banerjee CK, Jindal SK, Talwar P,
Chakrabarti A.. Fatal pulmonary sporotrichosis caused by *Sporothrix*
schenckii var. *luriei* in India. *J Clin Microbiol* 1992; **30**: 2492-2494.
10. Swofford DL. 2001. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony
(*and other methods) (version 4.0). Sinauer Associates, Sunderland,
Mass.
11. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Reference method
for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts*. Approved
standard. M38A. National Committee for Clinical Laboratory Standards,
Wayne, Pa 2002.
12. Trilles L, Fernández-Torres B, Dos Santos Lazera M, Wanke B, De
Oliveira Schubach A, de Almeida Paes R, Inza I, Guarro J. In vitro
antifungal susceptibilities of *Sporothrix schenckii* in two growth phases.
Antimicrob Agents Chemother 2005; **49**: 3952-3954.

Fig. 1. One of the 9 most parsimonious trees obtained from heuristic searches, based on an analysis produced from the combined data set. Bootstrap support values above 75% are indicated at the nodes. CI, consistency index; RI, retention index; HI, homoplasy index. Type strains are indicated with boldface type.

Fig. 2. *Sporothrix luriei* CBS 937.72. (A) Colony on PDA at 30°C after 14 days. (B) Sympodial and sessile conidia. (C) Sympodial conidia at the end of a conidiophore. (D) Sessile conidium on a vegetative hypha. Bars (B) 25 μ m, (C and D) 10 μ m.

TABLE 1. Fungal species, source code, geographical origin and EMBL accession numbers of the isolates included in the study

Isolate	Source	Accession numbers		
		CHS	Bt2	CAL
<i>S. albicans</i>				
CBS 302.73 T	Environmental, United Kingdom	AM748692*	AM498343	AM398396
CBS 111110	Zootermopsis nevadensis, Germany	AM748693*	AM747286*	AM398382
<i>S. brasiliensis</i>				
CBS 120339 T	Clinical, Brazil	AM117417	AM116946	AM116899
IPEC 16919	Clinical, Brazil	AM117407	AM116934	AM116898
IPEC 22496.4	Clinical, Brazil	AM117413	AM116950	AM116895
<i>S. globosa</i>				
CBS 120340 T	Clinical, Spain	AM117422	AM116966	AM116908
NBRC 6072	NK	AM117420	AM116960	AM116904
FMR 8595	Clinical, Spain	AM117425	AM116959	AM116905
<i>S. mexicana</i>				
CBS 120341 T	Environmental, Mexico	AM748696*	AM498344	AM398393
CBS 120342	Environmental, Mexico	AM748697*	AM747288*	AM398392
<i>S. schenckii</i>				
CBS 359.36 T	Clinical USA	AM114872	AM116911	AM117437
UTHSC 04-1064	Clinical, USA	AM748694*	AM747285*	AM399014
UTHSC 04-771	Clinical, USA	AM748695*	AM747287*	AM398985
<i>S. schenckii</i> var. <i>luriei</i>				
CBS 937.72 T	Clinical, South Africa	AM748698*	AM747289*	AM747302*

Abbreviature used: CBS, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands; FMR, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Reus, Spain; IPEC, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fiocruz, Brazil; NBRC, Biological Resource Center - Chiba, Japan; UTHSC, Fungus Testing Laboratory, University of Texas Health Science Center, Texas; BT2, β -tubulin gene; CHS, chitin synthase gene; CAL, calmodulin gene; NK, not know; **T**, type strain; *sequences newly generated in this study.

TABLE 2. Absolute number of differences between nucleotide sequences of the type strains of *S. schenckii* complex, included in the study, compared with the isolate CBS 937.72

Species	CHS	Bt2	CAL
<i>S. albicans</i>	20	67	121
<i>S. brasiliensis</i>	11	31	62
<i>S. globosa</i>	10	19	70
<i>S. mexicana</i>	18	63	124
<i>S. schenckii</i>	13	26	63

CHS: chitin synthase; Bt2: beta-tubulin; CAL: calmodulin

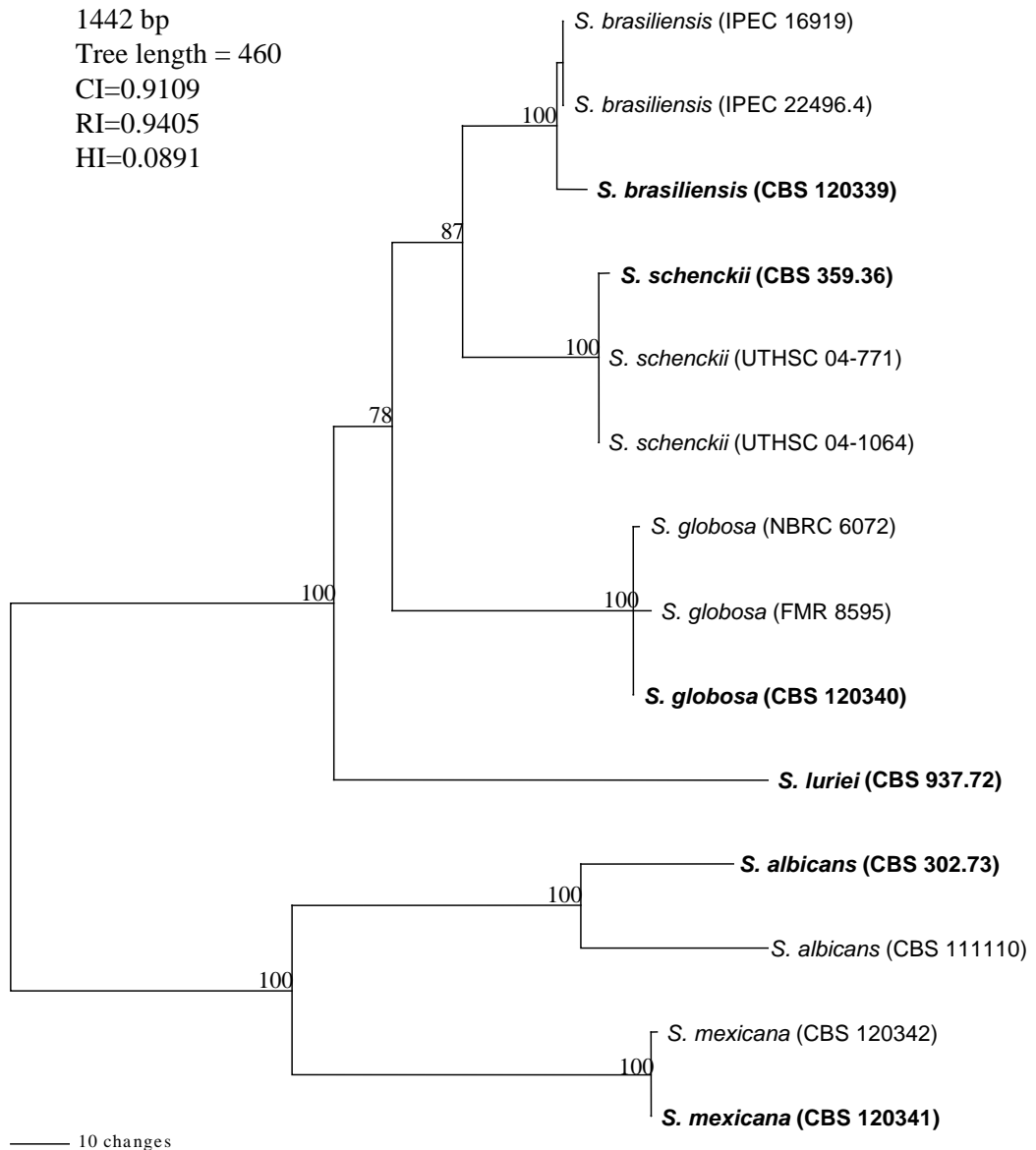


Fig. 1.

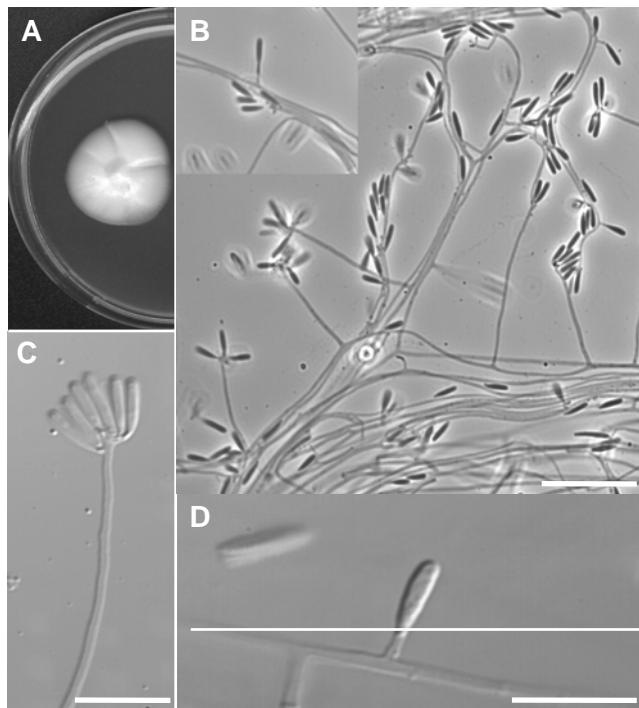


Fig. 2.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

FILOGÈNIA MOLECULAR I CARACTERITZACIÓ FENOTÍPICA DEL COMPLEX D'ESPÈCIES DE
SPOROTHRIX SCHENCKII

Rita Marimón Picó

ISBN: 978-84-691-1554-1 /DL:T.147-2008

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
FILOGÈNIA MOLECULAR I CARACTERITZACIÓ FENOTÍPICA DEL COMPLEX D'ESPÈCIES DE
SPOROTHRIX SCHENCKII
Rita Marimón Picó
ISBN: 978-84-691-1554-1 /DL:T.147-2008

ANNEX 6

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

FILOGÈNIA MOLECULAR I CARACTERITZACIÓ FENOTÍPICA DEL COMPLEX D'ESPÈCIES DE
SPOROTHRIX SCHENCKII

Rita Marimón Picó

ISBN: 978-84-691-1554-1 /DL:T.147-2008

Different virulence of the species of *Sporothrix* of clinical interest in a murine model

Rita Marimon, Marçal Mariné, Josepa Gené, Josep Cano and Josep Guarro*

Unitat de Microbiologia, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Virgili, 43201 Reus, Spain.

Corresponding author. Mailing address: Unitat de Microbiologia, Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Virgili, Carrer Sant Llorenç 21, 43201-Reus, Tarragona, Spain. Phone: 34 977759359. Fax: 34 977759322. E-mail: josep.guarro@urv.cat

Abstract

A comparative study on the experimental pathogenicity of five species of *Sporothrix* of clinical interest, i.e. *S. albicans*, *S. brasiliensis*, *S. globosa*, *S. mexicana* and *S. schenckii sensu stricto*, was performed using a murine model with immunocompetent mice. Two strains of each species were used. Two inocula of each strain, i.e. 1×10^8 and 1×10^5 conidia/ml, were tested, the animals being infected intravenously. Only the low inoculum of one strain of *S. brasiliensis* and the high inoculum of the strains of *S. brasiliensis* and *S. schenckii* were able to cause 100% mortality. The other inocula and species tested did not kill any animal.

Keywords: *Sporothrix schenckii*, virulence, murine model.

1. Introduction

Sporotrichosis is a chronic subcutaneous disease caused by the dimorphic fungus *Sporothrix schenckii* characterized by the development of lymphatic nodules in humans and in some animals. The fungus is found in habitats that are rich in organic matter and in regions with a warm, humid climate [1], and infects humans through traumatic implantation into the skin of mycelia or conidia from the soil, wood or plants. In recent years, the incidence of the disease has gradually increased in humans, mostly veterinarians, nurses and cat owners. The latter are usually infected through cat scratches or bites or even by direct contact with exudates of feline lesions [2]. In addition, some studies showed that isolates obtained from clinical cases were more pathogenic than those from the environment [1,3].

Sporothrix schenckii had been traditionally considered a well-defined species, with no significant intraspecific variations, but recent molecular studies have shown that this fungus is a complex of phylogenetic species with a different geographical distribution [4, 5]. Apart from *S. schenckii sensu stricto* three new species have been proposed in the complex and they have been characterized phenotypically. They are *S. brasiliensis* and *S. globosa* associated with human infections, and *S. mexicana* that up to now has only included isolates of environmental origin [6]. It is unknown if the different types of infections with different degrees of severity attributed to *S. schenckii* correspond to different species of the complex or if they are caused by different isolates of a same species. Further studies are required to determine these issues. We have demonstrated previously that the species of the complex showed different antifungal susceptibility [Marimon, R., Serena, C., Gené, J., Cano, J. and Guarro, J. In vitro antifungal susceptibilities of 5 species of *Sporothrix*. "unpublished"]. In the present study we compare the virulence of the different species of the complex in a murine model of disseminated infections.

2. Materials and Methods

2.1. Fungi and inoculum preparation

A total of 10 isolates of *Sporothrix* spp. were used in the study, two isolates corresponding to each of the following species: *S. albicans*, *S. brasiliensis*, *S. globosa*, *S. mexicana* and *S. schenckii* (Table 1). The isolates were stored on corn-meal agar (30 g corn, 15 g agar, 1 L tap water) slants

covered with paraffin oil, and prior to the study they were cultured on PDA for 8 days at 30°C. For each isolate, two inocula were prepared, i.e. 1×10^8 conidia/ml (high) and 1×10^5 conidia/ml (low), with the exception of the isolate CBS 120339, whose high inoculum was of 6×10^6 conidia/ml. The inocula were prepared by flooding the surface of the agar plate with sterile saline, scraping the sporulating mycelium with a culture loop, and drawing up the resultant suspension with a sterile Pasteur pipette. The suspensions were then filtered once through sterile gauze to remove hyphae. The number of conidia in the suspension was counted with a haemocytometer and adjusted to the predetermined inoculum. The viability of these inocula was verified by plating dilutions of the suspension on PDA plates.

2.2. Animals

OF1 male mice (Charles River, Criffa SA, Barcelona, Spain) with a mean weight of 32 g were used. Animals were housed ten per cage in standard boxes with corncob bedding and free access to food and water. The Animal Welfare Committee of the Faculty of Medicine of the University approved the conditions.

2.3. Infection

We established 21 groups of 10 mice, one for each isolate and each of the two inocula, and a control group of non-infected mice. 200 µl of inoculum suspension was injected intravenously via the lateral tail vein. Mortality was recorded daily for 40 days.

2.4. Statistical analysis

Mean survival time (MST) was estimated by the Kaplan-Meier method and compared among groups by the log-rank test. P values of <0.05 were considered statistically significant.

3. Results

The results have shown a clear correlation between the size of the inoculum and the mortality rate. When the low inocula were tested, only the isolate IPEC 16919 of *S. brasiliensis* caused the death of all the mice between days 30 and 37, while mice infected with the other isolates were alive at the end of the experiment. All the animals infected with the high inocula of *S. albicans*, *S. globosa* and *S. mexicana* survived at the end of the experiment, while all the animals infected with the high inocula of *S. brasiliensis* and *S. schenckii* died between days 9 and 23, with no significant differences among them ($P>0.05$) (Fig. 1).

The majority of mice infected with both inocula of the species *S. brasiliensis* and *S. schenckii* showed cutaneous lesions in their tails (Fig. 2) and orchitis, while those infected with the other three species did not show any apparent lesion with any of the two inocula. All the isolates that showed virulence were of clinical origin, with the exception of *S. globosa*, although both isolates were of clinical origin they did not cause the death of any animal.

4. Discussion

Some authors have previously studied the virulence of different strains of *S. schenckii* [7, 8, 9], but their results are difficult to compare with our findings since it is unknown to which of the current accepted species of *Sporothrix* they referred.

Dixon et al. [3] studied five clinical and 60 environmental isolates from the largest U.S. epidemic of sporotrichosis, which occurred in 1988, and they correlated the mortality rate of the isolates tested with the capacity for growth at 37°C, the production of melanin, and their origin (clinical or environmental). They concluded that the environmental isolates, that did not produce pigmented conidia, were not virulent. These results agree with ours concerning *S. albicans*, since the two isolates of this species tested in our study were of environmental origin, and they do not show pigmented conidia. They also studied two environmental isolates that produced pigmented conidia and that grew at 35°C but not at 37°C, which were found not to be virulent. This finding also agrees with our results concerning *S. globosa*. Although the two isolates of this species tested in our study were from clinical origin, this species included isolates from clinical and from environmental origin, have pigmented conidia, and are able to grow at 35°C but not at 37°C. By contrast, our results did not completely agree with those of Mackinnon et al. [8], since in that work only the isolates with pigmented conidia produced lesions in the testicles and tails of the mice. In our study the isolates of *S. globosa* and *S. mexicana*, which show pigmented conidia, did not produce those lesions in the mice.

More recently, Mesa-Arango et al. [4] compared the virulence of isolates of *S. schenckii* from different geographical regions, and did not find any relationship among them. However, the environmental isolates generally showed the highest virulence. This finding also contrasts with our study, where the highest virulence was shown by the clinical isolates.

In conclusion, the results of this study revealed significant differences in the degree of virulence between the different species of *Sporothrix*, the clinical isolates of *S. schenckii* and *S. brasiliensis* clearly being more virulent than the others. Now that we know the differences in the virulence and in the response to antifungals [Marimon, R., Serena, C., Gené, J., Cano, J. and Guarro, J. In vitro antifungal susceptibilities of 5 species of *Sporothrix*. "unpublished"] among the different species of the *S. schenckii* complex, it is important to identify these species in the clinical setting. This is crucial for the correct treatment of such infections and for a better knowledge of their epidemiology. This task can be facilitated by the use of molecular and phenotypic markers that were recently described [6].

5. Acknowledgments

The authors are indebted to the curators of the culture collections indicated in Table 1 for supplying the strains used in the study. This study was supported by Spanish Ministerio de Ciencia y Tecnología, grants CGL 2004-00425/BOS and CGL 2005-07394.

6. References

- [1] G.H. Findlay, H.F. Vismer. Studies in sporotrichosis: fungal morphogenesis and pathogenicity in differing environments. *Mycopathologia* 96 (1986)115-22.
- [2] M. de O. Nobre, T. de A. Antunes, R.O. de Faria, M.B. Cleff, C.G. Fernández, A.C. Muschner, M.C. Meireles, L. Ferreira. Differences in virulence between isolates of feline sporotrichosis. *Mycopathologia* 160 (2005) 43-49.
- [3] D.M. Dixon, R.A. Duncan, N.J. Hurd. Use of a mouse model to evaluate clinical and environmental isolates of *Sporothrix* spp. from the largest U.S. epidemic of sporotrichosis. *J. Clin. Microbiol.* 30 (1992) 951-954.
- [4] A.C. Mesa-Arango, M. Del Rocío Reyes-Montes, A. Pérez-Mejía, H. Navarro-Barranco, V. Souza, G. Zúñiga, C. Toriello. Phenotyping and genotyping of *Sporothrix schenckii* isolates according to geographic origin and clinical form of sporotrichosis. *J. Clin. Microbiol.* 40 (2002) 3004-3011.
- [5] R. Marimon, J. Gené, J. Cano, L. Trilles, M. Dos Santos Lazera, J. Guarro. Molecular phylogeny of *Sporothrix schenckii*. *J. Clin. Microbiol.* 44 (2006) 3251-3256.

- [6] R. Marimon, J. Cano, J. Gené, D.A. Sutton, M. Kawasaki, J. Guarro. *S. brasiliensis*, *S. globosa* and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* species of clinical interest. J. Clin. Microbiol. 45 (2007).
- [7] D.H. Howard, G.F. Orr. Comparison of strains of *Sporotrichum schenckii* isolated from nature. J. Bacteriol. 85 (1963) 816-821.
- [8] J. Mackinnon, I. Conti-Diaz, E. Gezuele, E. Civila, S. da Luz. Isolation of *Sporothrix schenckii* from nature and considerations on its pathogenicity and ecology. Sabouraudia 7 (1969) 38-45.
- [9] R. Ferreti de Lima, G. Vidal Schäffer, C. de Moraes Borba. Variants of *Sporothrix schenckii* with attenuated virulence for mice. Microbes Infect. 5 (2003) 933-938.

Fig. 1 Survival of mice infected with *Sporothrix* spp. Mice were infected with 1×10^8 conidia/ml, with the exception of the isolate CBS 120339 which was 6×10^6 . *S. schenckii* isolates UTHSC 99-173 (□) and UTHSC 01-2137 (Δ), *S. brasiliensis* isolates CBS 120339 (▼) and IPEC 16919 (◆).

Fig. 2. Experimental sporotrichosis. Ulcerated nodules on the tail of a mouse infected with the strain *S. brasiliensis* IPEC 16919.

Table 1. Isolates of *Sporothrix* spp. included in the study and their origins

Species	Strain	Origin
<i>S. schenckii</i>	UTHSC 99-173	Biopsy tissue hand, USA
	UTHSC 01-2137	Skin ulcer, USA
<i>S. brasiliensis</i>	CBS 120339	Skin lesion, Brazil
	IPEC 16919	Skin lesion, Brazil
<i>S. globosa</i>	CBS 120340	Face lesion, Spain
	MCCL 220082	Unknown, India
<i>S. mexicana</i>	CBS 120341	Soil, Mexico
	CBS 120342	Carnation leaves, Mexico
<i>S. albicans</i>	CBS 302.73	Soil, UK
	KMU4217	Wheat, China

Abbreviations: UTHSC, University of Texas Health Science center, USA; MCCL, Mycology Culture Collection Laboratory, Postgraduate Institute of Medical Education and Research, Chandigarh, India; IPEC, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fiocruz, Brazil; CBS, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Holanda; KMU Kanazawa Medical University, Ishikawa, Japan.

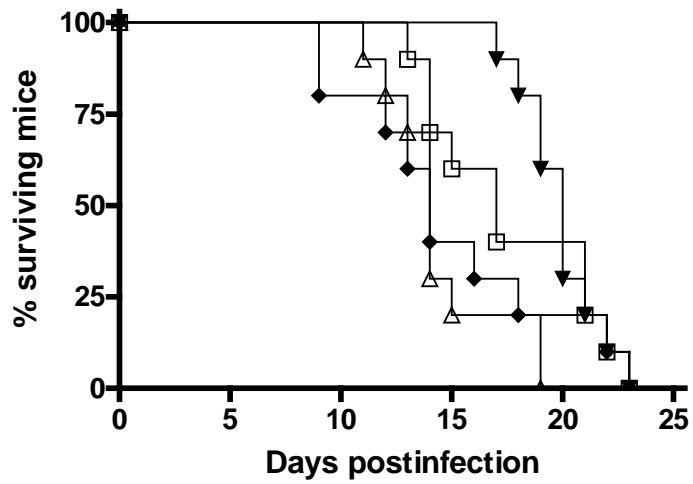


Fig. 1



Fig. 2

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
FILOGÈNIA MOLECULAR I CARACTERITZACIÓ FENOTÍPICA DEL COMPLEX D'ESPÈCIES DE
SPOROTHRIX SCHENCKII
Rita Marimón Picó
ISBN: 978-84-691-1554-1 /DL:T.147-2008

ANNEX 7

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

FILOGÈNIA MOLECULAR I CARACTERITZACIÓ FENOTÍPICA DEL COMPLEX D'ESPÈCIES DE
SPOROTHRIX SCHENCKII

Rita Marimón Picó

ISBN: 978-84-691-1554-1 /DL:T.147-2008

Soca*	Prova
-------	-------

[illegible]

Resultats de les proves fisiològiques de les soques del complex d'Sporothrix schenckii (Cont.)

Soca*		8298	8304	8305	8307	8308	8309	8310	8311	8313	8314	8316	8317	8318	8319	8320	8321	8322	8323	8324	8327
Prova																					
Nitrat		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	f	f	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitrit		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	f
L-isina		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Cadaverina		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Creatina		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Creatinina		-	+	+	-	f	+	+	+	+	+	f	-	+	+	+	+	+	-	f	f
NaCl 2%		-	f	f	-	-	f	-	+	f	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-
NaCl 5%		-	-	-	-	-	-	-	f	-	f	-	-	f	f	-	-	-	-	-	-
NaCl 7%		-	-	-	-	-	-	-	-	-	f	-	-	f	-	-	-	-	-	-	-
NaCl 10%		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
MgCl2 2%		f	+	+	f	+	+	-	+	+	+	f	-	+	+	f	+	f	+	f	+
MgCl2 5%		-	f	f	f	+	f	-	+	+	+	-	-	+	+	f	f	+	-	-	f
MgCl2 7%		-	f	-	-	f	f	-	+	f	+	-	-	+	+	-	f	+	-	-	-
MgCl2 10%		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Cicloheximida 0.1%		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cicloheximida 0.25%		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cicloheximida 1%		+	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	+	f	f	-	f	f	f
Midó		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ureasa		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ Prova positiva; - Prova negativa; f creixement feble; nt prova no testada; *Número de soca corresponent a la col·lecció de cultius de la Facultat de Medicina de Reus (FMR)

Resultats de les proves fisiològiques de les soques del complex d'Sporothrix schenckii (Cont.)

[illegible]

Resultats de les proves fisiològiques de les soques del complex d'Sporothrix schenckii (Cont.)

Prova	Soca*																			
Nitrat	8328	8329	8331	8332	8334	8335	8337	8299	8504	8605	8609	8371	8608	8370	8364	8362	8679	8678	8365	8607
Nitrit	f	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	f	+	+	+	+	f	+	+
L-isina	-	f	-	-	-	f	f	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Cadaverina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Creatina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Creatinina	+	+	+	+	f	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	f	+	+	+
NaCl 2%	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	f	+	+	+	+	+	+	+
NaCl 5%	-	f	+	+	-	-	-	+	+	+	+	f	+	+	f	+	+	+	+	f
NaCl 7%	-	-	f	f	-	-	-	+	+	+	+	f	-	+	f	+	+	+	+	-
NaCl 10%	-	-	f	-	-	-	-	f	f	f	f	f	-	f	f	+	+	+	+	+
MgCl2 2%	f	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MgCl2 5%	f	+	+	+	f	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MgCl2 7%	-	+	+	+	f	+	-	+	+	+	+	+	f	f	+	+	+	+	+	+
MgCl2 10%	-	+	+	f	-	+	-	+	+	+	f	f	+	f	+	+	+	+	+	f
Cicloheximida 0.1%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cicloheximida 0.25%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cicloheximida 1%	f	+	+	f	f	+	f	f	+	f	f	+	f	+	f	f	f	f	f	f
Midó	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ureasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ Prova positiva; - Prova negativa; f creixement feble; nt prova no testada; *Número de soca corresponent a la col·lecció de cultius de la Facultat de Medicina de Reus (FMR)

Soca*	Prova
-------	-------

[illegible]

Resultats de les proves fisiològiques de les soques del complex d'Sporothrix schenckii (Cont.)

Soca*		8298	8304	8305	8307	8308	8309	8310	8311	8313	8314	8316	8317	8318	8319	8320	8321	8322	8323	8324	8327
Prova		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	f	f	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitrat		+	+	-	-	f	+	-	+	+	f	f	f	-	+	+	f	-	+	-	f
Nitrit		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-isina		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cadaverina		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Creatina		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Creatinina		-	+	+	-	f	+	+	+	+	+	f	-	+	+	f	+	+	-	f	f
NaCl 2%		-	f	f	-	-	f	-	+	f	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-
NaCl 5%		-	-	-	-	-	-	-	f	-	f	-	-	f	f	-	-	-	-	-	-
NaCl 7%		-	-	-	-	-	-	-	-	-	f	-	-	f	-	-	-	-	-	-	-
NaCl 10%		+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
MgCl2 2%		f	+	+	f	+	+	-	+	+	+	f	-	+	+	f	+	f	+	f	+
MgCl2 5%		-	f	f	f	+	f	-	+	+	+	-	-	+	+	f	f	+	-	-	f
MgCl2 7%		-	f	f	-	f	f	-	+	f	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-
MgCl2 10%		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Cicloheximida 0.1%		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cicloheximida 0.25%		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cicloheximida 1%		+	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	+	f	f	-	f	f	f
Midó		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ureasa		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ Prova positiva; - Prova negativa; f creixement feble; nt prova no testada; *Número de soca corresponent a la col·lecció de cultius de la Facultat de Medicina de Reus (FMR)

Resultats de les proves fisiològiques de les soques del complex d'Sporothrix schenckii (Cont.)

Soca*		554-1 /DL:T.14/-2008																				
Prova		8328	8329	8331	8332	8334	8335	8337	8299	8504	8605	8609	8371	8608	8370	8364	8362	8679	8678	8365	8607	8604
Glucosa		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
d-Galactosa		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
d-glucosamida		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
d-ribosa		-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	f	+	+
d-xilosa		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Arabinosa		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
d-Arabinosa		-	f/-	+	+	+	f/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-ramnosa		f	+	+	+	-	+	+	f	f	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sucrosa		-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltosa		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Trealosa		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Celobiosa		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicina		f	f	-	f	f	f	f	f	-	f	f	f	f	-	f	-	-	f	f	f	+
Melibiosa		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactosa		-	+	+	+	f/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	f	+	+	+	+
Rafinosa		-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicerol		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ribitol		-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	f	+	+
Xilitol		f	f	+	f	f	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	f	+	+
L-sorbosa		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-arabinitol		+	+	+	+	+	f	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
d-manitol		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inositol		+	+	+	+	+	+	+	f	+	+	+	+	f/-	+	+	+	+	+	f	+	+
Citrat		f	f	-	f	f	-	f	f	+	f	f	-	f/-	+	-	f	+	f	+	-	-
Metanol		+	f/-	-	+	+	f	f	f	+	f	+	+	+	f	+	f	f	f	f	f	f
Etanol		+	+	+	+	+	+	f	f	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ac.lactic		-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ac.tannic		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ac.malic		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
d-fructosa		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
d-manosa		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
d-melectiosa		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
d-glucitol		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Dextrina		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Resultats de les proves fisiològiques de les soques del complex d'Sporothrix schenckii (Cont.)

Prova	Soca*																			
Nitrat	8328	8329	8331	8332	8334	8335	8337	8299	8504	8605	8609	8371	8608	8370	8364	8362	8679	8678	8365	8607
Nitrit	f	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	f	+	+	+	+	f	+	+
L-isina	-	f	-	-	-	f	f	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Cadaverina	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+
Creatina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Creatinina	+	+	+	+	f	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	f	+	+	+
NaCl 2%	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	f	+	+	+	+	+	+	+
NaCl 5%	-	f	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	f	+	+	+	+	f
NaCl 7%	-	-	f	f	-	-	-	+	+	+	+	f	-	+	f	+	+	+	+	-
NaCl 10%	-	-	f	-	-	-	-	f	f	f	f	f	-	f	f	+	+	+	+	+
MgCl2 2%	f	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MgCl2 5%	f	+	+	+	f	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MgCl2 7%	-	+	+	+	f	+	-	+	+	+	+	+	f	f	+	+	+	+	+	+
MgCl2 10%	-	+	+	f	-	+	-	+	+	+	f	f	+	f	+	+	+	+	+	f
Cicloheximida 0.1%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cicloheximida 0.25%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cicloheximida 1%	f	+	+	f	f	f	f	f	+	f	f	+	f	+	f	f	f	f	f	f
Midó	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ureasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ Prova positiva; - Prova negativa; f creixement feble; nt prova no testada; *Número de soca corresponent a la col·lecció de cultius de la Facultat de Medicina de Reus (FMR)

	Soca*														
8606	8604	8369	8368	8367	8366	8595	8601	8594	8505	8596	8597	8600	8598	8506	8602

[illegible]

Resultats de les proves fisiològiques de les soques del complex d'Sporothrix schenckii (Cont.)

Soca*		8606	8604	8369	8368	8367	8366	8595	8601	8594	8505	8596	8597	8600	8598	8506	8602	8363	8677	9107	9108	8791	8798	8803	8782
Prova																									
Nitrat		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitrit		f	f	-	f	f	+	f	f	f	+	-	-	f	+	+	f	f	-	+	+	f	f	-	-
L-lisina		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cadaverina		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Creatina		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Creatinina		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NaCl 2%		+	+	+	+	+	+	+	+	+	f	+	+	+	+	-	+	+	+	+	f	-	+	+	+
NaCl 5%		+	+	+	+	+	+	+	f	f	f	+	+	+	+	-	+	+	+	+	f	-	+	+	+
NaCl 7%		+	+	+	+	+	+	f	f	-	f	f	f	+	+	-	+	+	f	f	f	-	+	+	+
Nacl 10%		f	-	+	+	+	f	f	-	-	f	f	f	+	f	-	f	f	f	f	f	-	+	+	+
MgCl2 2%		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MgCl2 5%		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MgCl2 7%		+	f	+	+	+	+	+	+	f	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MgCl2 10%		f	f	+	+	+	+	f	f	f	f	+	+	+	+	-	+	+	f	+	+	+	+	+	f
Cicloheximida 0.1%		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cicloheximida 0.25%		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cicloheximida 1%		f	-	f	f	+	+	-	f	+	+	f	+	+	f	+	f	+	f	+	f	-	+	+	f
Midó		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ureasa		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ Prova positiva; - Prova negativa; f creixement feble; nt prova no testada; *Número de soca corresponent a la col·lecció de cultius de la Facultat de Medicina de Reus (FMR)

Resultats de les proves fisiològiques de les soques del complex d'Sporothrix schenckii (Cont.)

Prova	Soca*	9009	9056	9014	9010	9001	9008	9012	8998	8997	8994	9109	9005	9017	9051	9062	9058	9052	9055	9018	8804	9290
Nitrat		nt	nt	+	+	+	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	+	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
Nitrit		+	nt	+	+	+	+	nt	f	+	f	+	nt	+	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
L-isina		nt	-	-	-	-	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	-	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
Cadaverina		nt	nt	+	+	+	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	+	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
Creatina		nt	nt	+	+	+	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	+	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
Creatinina		+	+	+	+	+	nt	nt	+	+	+	nt	nt	+	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
NaCl 2%		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	nt	nt	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NaCl 5%		-	+	-	-	+	+	+	f	+	-	f	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NaCl 7%		-	-	-	-	-	-	-	-	f	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
NaCl 10%		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
MgCl2 2%		+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
MgCl2 5%		+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
MgCl2 7%		+	+	-	+	+	+	+	+	+	f	+	+	+	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
MgCl2 10%		f	-	-	+	-	f	-	-	+	-	-	-	-	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
Cicloheximida 0.1%		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
Cicloheximida 0.25%		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
Cicloheximida1%		f	+	-	+	+	+	f	+	+	-	-	+	+	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
Midó		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
Ureasa		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt

+ Prova positiva; - Prova negativa; f creixement feble; nt prova no testada; *Número de soca corresponent a la col·lecció de cultius de la Facultat de Medicina de Reus (FMR)

Resultats de les proves fisiològiques de les soques del complex d'Sporothrix schenckii (Cont.)

Prova \ Soca*	8783	8788	8795	8800	8784	8787	8789	8790	8792	8796	8797	8799	8785	8786	8801	8716	8978	9289	9288	9136	9067
Glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sucrosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rafinosa	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+
Ribitol	+	+	+	+	+	-	-	-	f	-	+	+	+	f	+	-	+	+	+	+	+
NaCl 5%	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NaCl 7%	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ Prova positiva; - Prova negativa; f creixement feble; nt prova no testada; *Número de soca corresponent a la col·lecció de cultius de la Facultat de Medicina de Reus (FMR)

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

FILOGÈNIA MOLECULAR I CARACTERITZACIÓ FENOTÍPICA DEL COMPLEX D'ESPÈCIES DE
SPOROTHRIX SCHENCKII

Rita Marimón Picó

ISBN: 978-84-691-1554-1 /DL:T.147-2008